

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 359 203**

21 Número de solicitud: 200930966

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **06.11.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
19.05.2011

71 Solicitante/s:
Universidad Autónoma de Madrid (Titular al 70 %)
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC) (Titular al 30 %)

72 Inventor/es: **Kremer Barón, Leonor;**
Carrasco Llamas, Luis y
Pisa García, Diana

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína GAPDH de *Candida famata*.**

57 Resumen:

Anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína GAPDH de *Candida famata*.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o cualquiera de sus fragmentos, obtenido del hibridoma depositado con nº de acceso ECACC09042201. Dicho anticuerpo es capaz de reconocer la proteína GAPDH de *Candida famata*. Asimismo, la presente invención se refiere a dicho hibridoma, al epítipo de la proteína GAPDH de *Candida famata* reconocido por dicho anticuerpo monoclonal, a los usos de hibridoma, anticuerpo o epítipo, o al kit que los comprende. Además, la presente invención se refiere a un método para la detección de *Candida famata* o para la determinación de la evolución de candidiasis producida por dicho microorganismo.

ES 2 359 203 A1

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína GAPDH de *Candida famata*.

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o cualquiera de sus fragmentos, obtenido del hibridoma depositado con nº de acceso ECACC09042201. Dicho anticuerpo es capaz de reconocer la proteína GAPDH de *Candida famata*. Asimismo, la presente invención se refiere a dicho hibridoma, al epítipo de la proteína GAPDH de *Candida famata* reconocido por dicho anticuerpo monoclonal, a los usos de hibridoma, anticuerpo o epítipo, o al kit que los comprende. Además, la presente invención se refiere a un método para la detección de *Candida famata* o para
10 la determinación de la evolución de candidiasis producida por dicho microorganismo.

Estado de la técnica anterior

15 El diagnóstico temprano de la candidiasis invasiva es extremadamente difícil ya que los síntomas no son específicos, lo que conduce a un retraso en la aplicación de una terapia adecuada (Laín *et al.*, 2008. Clin. Dev. Immunol., 2008: art. ID 721950.). Esto ha impulsado el desarrollo de numerosas técnicas de diagnóstico, que pueden clasificarse como observación microscópica, métodos basados en cultivos microbiológicos y métodos independientes de cultivo (White *et al.*, 2005. J. Clin. Microbiol., 43: 2181-2187).

20 La observación microscópica puede aportar, en algunos casos, un diagnóstico tentativo, ya que la presencia de determinadas estructuras puede asociarse con ciertos géneros o especies. Sin embargo, aunque es una técnica rápida, pueden confundirse elementos fúngicos con componentes celulares del propio paciente, dando lugar a falsos positivos. Asimismo, presenta el inconveniente de que, en ocasiones, se requieren procedimientos invasivos que no pueden realizarse sin suponer un riesgo para el paciente (Stevens, 2002. J. Antimicrob. Chemother., 49 [suppl.S1]: 11-19).

25 Otras técnicas microbiológicas tradicionales son los cultivos sanguíneos, que producen frecuentemente falsos negativos (Yeo y Wong, 2002. Clin. Microbiol. Rev., 15: 465-484). Una vez que el organismo es aislado, la identificación puede tardar entre días y semanas, debido al lento crecimiento de los hongos. Debido a estos inconvenientes, se han desarrollado diferentes métodos independientes de cultivo, que se distinguen en función de que estén basados en identificación molecular, detección de componentes no antigénicos ó localización de anticuerpos y antígenos (Stevens, 30 2002. J. Antimicrob. Chemother., 49 [suppl.S1]: 11-19). Para aumentar la velocidad, sensibilidad y especificidad del diagnóstico, están siendo utilizados métodos moleculares basados en la PCR que permiten la detección y amplificación del DNA fúngico presente en las muestras (Weig y Brown, 2007. Trends Microbiol., 15: 310-317). Sin embargo, su alta sensibilidad puede plantear problemas al obtener falsos positivos asociados con la contaminación de la muestra. Para la detección de componentes no antigénicos en la sangre se han descrito como marcadores de infección el D-arabinitol y el β -1,3-D-glucano. El D-arabinitol es un metabolito producido por ciertas especies de *Candida*, no encontrándose hasta el momento *C. famata* entre ellas. Por su parte el β -1,3-D-glucano es un constituyente de la pared celular de levaduras y hongos filamentosos. Sin embargo, ambos métodos pueden generar falsos positivos. En el caso del D-arabinitol en pacientes con insuficiencia renal y en el de β -1,3-D-glucano en individuos sometidos a hemodiálisis o a
40 determinados tratamientos terapéuticos (Gadea *et al.*, 2007. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 25: 336-340).

Por otra parte, la detección de anticuerpos en pacientes con candidiasis suele tener utilidad limitada, ya que no distingue entre colonización e infección (Gadea *et al.*, 2007. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 25: 336-340) y suele tener resultados negativos cuando la sangre es recogida en las primeras fases de la infección, antes de la activación de
45 la respuesta humoral. Además, los individuos inmunodeprimidos no generan cantidades detectables de anticuerpos, incluso cuando presentan candidiasis sistémicas (Shoham y Levitz, 2005. Br J Haematol., 129: 569-582). Por este motivo se han intentado desarrollar inmunoensayos para detectar antígenos de *C. albicans* en el suero de individuos infectados (Laín *et al.*, 2008. Clin. Dev. Immunol., 2008: art. ID 721950.). Sin embargo, ninguno de ellos ha resultado suficientemente predictivo como para recomendarlo en una rutina de laboratorio clínico.

50 Otra de las patologías que podrían estar causadas por alguna especie de *Candida*, como por ejemplo *Candida famata*, es el AZOOR (*Acute Zonal Occult Outer Retinopathy*). Este término ha sido propuesto recientemente para describir un grupo heterogéneo de retinopatías de etiología desconocida, cada una de las cuales tiene su propia identidad clínica, pudiendo coincidir en el mismo paciente o ser formas transicionales de una misma enfermedad. Este síndrome se caracteriza por la pérdida aguda en una o más zonas de la función retinal externa, fopsias en algunos
55 casos, cambios mínimos en el fondo de ojo, que suelen implicar el estrechamiento de los vasos sanguíneos y palidez o incluso color blanquecino alrededor de la papila. Carrasco *et al* (Carrasco *et al*, 2005. J. Clin. Microbiol., 43: 635-640) abren la posibilidad a que *Candida famata* pueda ser la causa de AZOOR.

60 Por tanto, sería muy útil el desarrollo de un método que fuese capaz de detectar y/o cuantificar microorganismos causantes de candidiasis u otras patologías causadas por infección por candidas patógenas, como por ejemplo AZOOR, con alta sensibilidad, fiabilidad y rapidez.

Explicación de la invención

65 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o cualquiera de sus fragmentos, obtenido del hibridoma depositado con nº ECACC09042201. Dicho anticuerpo es capaz de reconocer la proteína GAPDH de *Candida famata*. Asimismo, la presente invención se refiere a dicho hibridoma, al epítipo de la proteína GAPDH de *Candida*

ES 2 359 203 A1

famata reconocido por dicho anticuerpo monoclonal, a los usos del hibridoma, anticuerpo o epítipo, o al kit que los comprende. Además, la presente invención se refiere a un método para la detección de *Candida famata* o para la determinación de la evolución de candidiasis producida por dicho microorganismo, así como al uso de los anticuerpos monoclonales de la presente invención con fines terapéuticos o para diagnóstico por imagen de candidiasis.

5 La selección del hibridoma de la presente invención, capaz de producir los anticuerpos que reconocen la proteína GAPDH, no es obvia a tenor de los resultados que se han obtenido y que se muestran en el apartado de ejemplos de la presente invención. El hibridoma depositado con n° ECACC09042201 produce una señal destacada en la detección de anticuerpos en comparación con el resto de hibridomas ensayados, lo que supone un efecto sorprendente y demuestra
10 que la selección no es obvia. Otro efecto sorprendente se refiere a la especificidad de dicho anticuerpo para la especie de *Candida famata* de entre diversas especies ensayadas del género *Candida*. La detección específica del antígeno en extractos proteicos derivados de cultivos celulares se muestra efectiva tanto en condiciones desnaturalizantes como en condiciones no desnaturalizantes.

15 El hibridoma obtenido se depositó en la *European Collection of Cell Cultures* (ECACC), con fecha 22 de Abril de 2009 y con la referencia de depósito 09042201. La dirección de la Autoridad Internacional de Depósito ECACC es: *Health Protection Agency/Centre for Emergency Preparedness and Response Porton Down/Salisbury/SP4 0JG/UK*.

20 Un aspecto de la presente invención se refiere a una célula del hibridoma depositado con n° 09042201 en la *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). En adelante puede emplearse el término "hibridoma ECACC09042201" para hacer referencia a una o más células de dicho hibridoma depositado. Un hibridoma es una línea celular híbrida obtenida mediante la fusión de un linfocito productor del anticuerpo específico de interés, con una línea celular de mieloma. Los hibridomas obtenidos después de fusionar células del bazo de ratones BALB/c, inmunizados con proteínas extracelulares producidas por *Candida famata*, con células de mieloma (X63.Ag.653 NP3), se han ensayado mediante
25 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) y se ha seleccionado el hibridoma ECACC09042201 que produce una señal destacada en la detección de anticuerpos contra alguna de las proteínas del extracto, de forma sorprendente, en comparación con el resto de hibridomas ensayados.

El hibridoma de la presente invención tiene las siguientes características:

30 Breve descripción: Hibridoma murino anti-proteína de *Candida famata*.

Cultivo celular de ratón BALB/c.

35 Inmunógeno: Proteínas extraídas de *Candida famata*.

Inmunocito donante: Ratón hembra BALB/c inmunizada.

40 Célula inmortal para su fusión con el inmunocito donante: Línea celular X63-Ag8.653.

Producto específico (antígeno): Proteína de 35 KDa aprox.

Tipo de Inmunoglobulina: IgG1.

45 Ensayo de screening: ELISA, *Western blot*, inmunofluorescencia.

Condiciones de depósito:

50 Concentración celular de $5 \times 10^6/0,5$ ml.

Composición del medio de cultivo: 90% fetal calf serum + 10% DMSO.

Información adicional:

55 Nombre de la línea celular: CF3.

Morfología: células redondas.

60 N° de pases: 50 aprox.

Condiciones de cultivo:

Medio de crecimiento: DMEM.

65 Porcentaje de suero y tipo: 15% fetal calf serum.

Suplementos: 1 mM Na piruvato, 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES (penicilina/estreptomicina si es necesario).

ES 2 359 203 A1

Temperatura: 37°C.

Fase gaseosa: 5% de CO₂ en el aire.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o cualquiera de sus alotipos o fragmentos, obtenido del hibridoma depositado con nº de acceso 09042201, que reconoce la proteína de *Candida famata* SEO ID NO: 1, o cualquiera de sus variantes. Un alotipo es el anticuerpo resultante de pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos en la región constante de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos originales. Mediante los datos divulgados en la presente invención se podrían obtener anticuerpos con la misma especificidad que los IgG1 pero con pequeños cambios en la secuencia que codifica para la cadena pesada, es decir, IgG2, 3 y 4.

Los anticuerpos monoclonales son una población idéntica de moléculas de anticuerpos, producidos por el mismo clon de linfocitos B, por lo que todos presentan la misma especificidad, reconociendo el mismo epítipo.

15 La secuencia SEO ID NO: 1 corresponde a la secuencia aminoacídica de la proteína GAPH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) de *Candida famata* (microorganismo también conocido como *Debaryomyces hansenii*).

El anticuerpo de la presente invención reconoce cualquier variante de la secuencia SEO ID NO: 1, o de cualquiera de sus fragmentos (siempre que contengan la secuencia aminoacídica reconocida de forma específica por dicho anticuerpo). Tal como se emplea en la presente invención, el término “variante” se refiere a una secuencia aminoacídica sustancialmente homologa a la secuencia SEO ID NO: 1. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término “variante” incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postraduccionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación. Cualquiera de las modificaciones descritas se produce en una posición aminoacídica que no afecta al reconocimiento de dicha proteína por medio del anticuerpo de la presente invención.

Una secuencia aminoacídica es “sustancialmente homologa” cuando tiene una identidad respecto a SEQ ID NO: 1 o respecto de cualquiera de sus fragmentos de, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 99%, y además, conservando la actividad biológica de dicha secuencia aminoacídica o de cualquiera de sus fragmentos, o son funcionalmente equivalentes. El término “funcionalmente equivalente”, tal como se emplea en la presente invención, se refiere a que secuencia aminoacídica o cualquiera de sus fragmentos mantiene esencialmente sus propiedades biológicas. Cualquier secuencia sustancialmente homologa a SEQ ID NO: 1 puede ser identificada por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

Una realización preferida se refiere al anticuerpo monoclonal, que reconoce una secuencia aminoacídica de dicha proteína de *Candida famata* que se selecciona de la lista de secuencias que comprende SEQ ID NO: 2 a 10, o cualquiera de sus fragmentos.

40 Tal como puede verse en los ejemplos de la presente invención, en la Fig. 2 se muestra la detección de antígenos mediante la adición del anticuerpo de la invención a extractos solubles (de proteínas) de *Candida famata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Los antígenos corresponden a una proteína de unos 35 KDa que se detecta en los extractos de *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula mucilaginosa*, pero no en especies más cercanas filogenéticamente como *Candida albicans*, *C. parapsilosis* o *C. glabrata*. En base a estos resultados, tras alinear las secuencias de *Candida albicans* (SEQ ID NO: 11; de acceso XP_719909.12) y *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 12; GAPDH2 de *Candida glabrata*, Nº de acceso Q6FSM4.1 y SEQ ID NO: 13; GAPDH1 de *Candida glabrata*, Nº de acceso Q6FPW3.1) con la secuencia SEQ ID NO: 1 mediante ClustalW (programa de alineamiento múltiple EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, con *clustering* NJ), se seleccionaron aquellos fragmentos con cambios sustanciales en algunos de los aminoácidos. La lista de secuencias SEQ ID NO: 2 a 10 corresponde a fragmentos de la secuencia SEQ ID NO: 1 que han sido seleccionados en base a dichas diferencias.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser sintetizados mediante tecnología recombinante de ADN. Para ello, es necesario disponer de la secuencia nucleotídica que codifica para cualquier anticuerpo de la presente invención y determinar el fragmento o fragmentos de interés para ser amplificado/s mediante PCR. Tras dicha amplificación puede llevarse a cabo su clonación junto a otras secuencias nucleotídicas o por sí sola, en un vector capaz de replicarse y obtener anticuerpos funcionales recombinantes. De esta manera pueden obtenerse anticuerpos sin necesidad de inmunizar a un animal. La obtención de dichos anticuerpos recombinantes se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica de clonación, aislamiento y/o purificación conocida en el estado de la técnica.

En adelante, para hacer referencia a cualquier anticuerpo monoclonal descrito en los párrafos anteriores, se empleará el término “anticuerpo de la invención” o “anticuerpo de la presente invención”.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un antisuero aislado que comprende el anticuerpo de la invención. El antisuero de la invención es el suero de cualquier animal que contiene el anticuerpo de la invención. Preferiblemente el animal es un mamífero. Preferiblemente el mamífero es un humano.

ES 2 359 203 A1

Un aspecto más de presente invención se refiere a un epítipo de la secuencia aminoacídica de *Candida famata* SEQ ID NO: 1, reconocido por el anticuerpo monoclonal de la invención. El epítipo es el determinante antigénico que produce una reacción específica con un anticuerpo. Dicho epítipo puede constar de una secuencia de aminoácidos sobre la superficie del antígeno; de una disposición o estructura terciaria concreta; o de una modificación postraduccional.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al epítipo de la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína GAPDH de *Candida famata*, SEQ ID NO: 1, que se selecciona de la lista de secuencias que comprende SEQ ID NO: 2 a 10, o cualquiera de sus fragmentos.

En adelante, para hacer referencia a cualquier epítipo descrito en los párrafos anteriores, se empleará el término “epítipo de la invención” o “epítipo de la presente invención”.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de *Candida famata* que comprende:

- a. obtener el extracto soluble de una muestra biológica aislada,
- b. añadir el anticuerpo de la invención al extracto celular del apartado (a) y
- c. detectar y/o cuantificar el anticuerpo monoclonal añadido en el apartado (b) que esté unido al epítipo de la invención.

La obtención del extracto soluble se lleva a cabo mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica. Dicho extracto soluble contiene las proteínas totales de la muestra biológica aislada. El término “muestra biológica aislada” se refiere a una muestra aislada que puede proceder de un fluido fisiológico como sangre, plasma, suero u orina y/o cualquier tejido celular procedente de un organismo. Preferiblemente el organismo es un mamífero. Preferiblemente el mamífero es un humano.

En el apartado (b) del método, se puede llevar a cabo la inmovilización de las proteínas contenidas en el extracto celular o la inmovilización del anticuerpo de la invención en un soporte sólido mediante diferentes procesos de unión. Se entiende por soporte sólido una gran variedad de materiales, como por ejemplo, pero sin limitarse, la resina de intercambio iónico o adsorción, el vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ester de celulosa, esferas paramagnéticas o cualquiera de sus combinaciones. Las proteínas pueden someterse a un proceso de separación en el soporte en el que son inmovilizadas.

El anticuerpo de la invención puede marcarse con un marcador seleccionado de la lista que comprende, pero sin limitarse, radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Asimismo, el anticuerpo de la invención que esté unido al antígeno (proteína GAPDH) se puede detectar de forma indirecta mediante la adición de anticuerpos anti-ratón marcados con alguno de los marcadores de la lista anterior. Los anticuerpos que no se hayan unido al antígeno serán eliminados mediante al menos un lavado. La detección puede llevarse a cabo mediante la adición de un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente, específico para el marcador. Preferiblemente el marcador es peroxidasa y el sustrato es cromogénico como por ejemplo, pero sin limitarse, tetrametilbencidina (TMB), ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) o fenilendiamina.

Por tanto, la detección del anticuerpo monoclonal (detección indirecta del antígeno al que se une) se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, ELISA o radioinmunoensayo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la determinación de la evolución de candidiasis producida por *Candida famata* que comprende:

- a. determinar, según el método anterior, una primera concentración de *Candida famata* en una muestra biológica aislada de un individuo,
- b. determinar, según el método anterior, una segunda concentración de *Candida famata* en otra muestra biológica del individuo del apartado (a), y
- c. comparar la segunda concentración obtenida en el apartado (b) con la primera concentración obtenida en el apartado (a) para determinar si hay o no alguna diferencia significativa.

La candidiasis es una infección producida por una o más especies de levaduras del género *Candida*. La candidiasis puede ser, pero sin limitarse, candidiasis crónica, candidiasis diseminada (sistémica) o candidiasis crónica muco-cutánea. En la presente invención, el término “candidiasis producida por *Candida famata*” hace referencia a cualquier tipo de candidiasis en la que intervenga el microorganismo *Candida famata* sólo o en combinación con otros microorganismos. Preferiblemente dichos microorganismos que pueden causar candidiasis en combinación con *Candida famata* son del género *Candida*.

En los ejemplos de la presente invención puede observarse que, tras el análisis de sueros de personas infectadas con *Candida famata*, se observó que el antígeno (GAPDH) puede detectarse en el suero mediante análisis en *slot blot*, así como que la cantidad de esta proteína varía o fluctúa a lo largo del tiempo en un paciente infectado en el que se han analizado sueros obtenidos a lo largo de varios años, es decir, dicho método es válido para la monitorización de un tratamiento de candidiasis o simplemente para observar la evolución de la enfermedad en relación a la cantidad de proteína GAPDH producida por *Candida famata*, medida indirecta de su presencia y/o actividad.

La determinación de la concentración de *Candida famata* se lleva a cabo mediante el método para su detección y/o cuantificación descrito en párrafos anteriores. La comparación de las concentraciones determinadas permite establecer si hay o no hay alguna diferencia significativa. El término “diferencia significativa” tal como se emplea en la presente invención hace referencia a que la diferencia observada no es el resultado del azar. Para determinar la influencia del azar en cada uno de los resultados obtenidos así como la determinación de alguna diferencia significativa, se puede aplicar cualquier técnica de estadística conocida en el estado de la técnica. Por ejemplo, pero sin limitarse, puede llevarse a cabo la repetición de las determinaciones al menos un nº de veces que permita, por ejemplo, pero sin limitarse, establecer una desviación típica respecto del valor promedio. Dicha diferencia significativa puede ser positiva o negativa. La diferencia significativa es positiva cuando el valor de la concentración de la primera determinación es mayor que el valor de la segunda concentración. Por el contrario, la diferencia significativa es negativa cuando el valor de la concentración de la primera determinación es menor que el valor de la segunda concentración.

La diferencia significativa depende de la técnica de detección que se emplee, en cualquier caso, puede emplearse una técnica semi-cuantitativa mediante la cual la determinación de la concentración se lleva a cabo por medio de la determinación de la intensidad de la banda detectada en la primera o segunda determinación de la concentración de *C. famata*. Si la diferencia significativa es negativa, se interpreta como que la candidiasis está remitiendo y si es positiva, la candidiasis está empeorando. Asimismo, los resultados obtenidos en cada una de las tomas de muestras se pueden comparar con los valores obtenidos para un control negativo y/o positivo.

La determinación de la evolución de dicha candidiasis comprende una serie de pasos que comienzan por la toma de muestras seriales. Se entiende por toma de muestras seriales a la extracción de las muestras biológicas mencionadas en la presente invención a diferentes tiempos en el mismo paciente.

La presente invención también se refiere a un método para la monitorización de un tratamiento de candidiasis producida por *Candida famata* que comprende las mismas etapas que el método descrito para la determinación de la evolución de candidiasis producida por *Candida famata*. En este caso, los pacientes han sido tratados para disminuir la infección con un agente determinado.

Una realización preferida se refiere al método para la detección y/o cuantificación de *Candida famata* o al método para la determinación de la evolución de un tratamiento de candidiasis producida por *Candida famata*, donde la muestra biológica aislada es un fluido biológico. El fluido biológico puede ser, pero sin limitarse, sangre, plasma, suero sanguíneo, orina, humor acuoso, humor vítreo o líquido cefalorraquídeo. Según una realización más preferida, el fluido biológico es suero sanguíneo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula del hibridoma depositado con nº de acceso ECACC09042201 para la producción del anticuerpo monoclonal de la invención.

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo monoclonal de la invención para la detección de *Candida famata*.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo de la invención para la determinación de la evolución de candidiasis producida por *Candida famata*.

En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo monoclonal de la invención se usa para detectar, cuantificar, aislar o purificar el antígeno que reconoce dicho anticuerpo. El antígeno detectado, aislado o purificado es cualquier antígeno que sea reconocido por el anticuerpo monoclonal de la presente invención. El antígeno puede provenir de cualquier organismo. Preferiblemente el antígeno proviene de un microorganismo. Más preferiblemente el microorganismo se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Rhodotorula mucilaginosa*. Preferiblemente el antígeno reconocido es la proteína GAPDH, cualquier variante de la misma o cualquiera de sus fragmentos.

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso del epítipo de la invención para la generación de cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal. Preferiblemente el anticuerpo es monoclonal. El epítipo de la invención debe estar aislado. Dicho epítipo puede ser introducido, preferiblemente por inyección intravenosa o intramuscular, en el cuerpo de un animal, preferiblemente mamífero, provocando con ello una respuesta inmune específica mediante la cual se generan anticuerpos específicos. De esta manera puede obtenerse un antisuero que contiene un anticuerpo capaz de reconocer al epítipo de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención. Una realización preferida de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica, donde el anticuerpo monoclonal está conjugado a un agente antibiótico, donde dicho agente es antifúngico. Para que el

anticuerpo pueda formar parte de una composición farmacéutica que vaya a ser aplicada al tratamiento de candidiasis en humanos, se deben generar previamente los anticuerpos monoclonales de la invención quiméricos o humanizados mediante ingeniería genética, evitando así el rechazo del sistema inmune al ser introducidos en el organismo. De esta manera se generan anticuerpos quiméricos o humanizados que incorporan parte animal (por ejemplo, de ratón) y parte humana. La parte correspondiente al ratón, es indispensable para que el anticuerpo reconozca el antígeno de *Candida famata* en el cuerpo y la parte humana es responsable de que el sistema inmunológico humano no lo rechace.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el epítipo de la invención. Dicho epítipo es la secuencia aminoacídica reconocida por el anticuerpo de la invención, aislada. Después de dicho aislamiento, su secuencia nucleotídica puede clonarse junto a otras secuencias nucleotídicas para formar parte de una secuencia recombinante.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica según cualquiera de los aspectos anteriores que además incluye excipientes farmacéuticamente aceptables. Una realización más preferida se refiere a la composición farmacéutica que además incluye otra sustancia activa.

Varios aspectos de la presente invención se refieren al anticuerpo o epítipo de la invención para su uso como medicamento.

Un aspecto más de la presente invención se refiere al anticuerpo de la invención para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de candidiasis producida por *Candida famata*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende el epítipo de la invención para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de candidiasis producida por *Candida famata*.

Un aspecto más de la presente invención es un kit que comprende la célula del hibridoma depositado con n° de acceso ECACC09042201. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit que comprende la célula del hibridoma depositado con n° de acceso ECACC09042201 para la producción del anticuerpo de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende el anticuerpo de la invención. Según otro aspecto de la invención, el kit que comprende el anticuerpo de la invención se usa para la detección de *Candida famata*.

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso del kit que comprende el anticuerpo de la invención para la determinación de la evolución de un tratamiento de candidiasis producida por *Candida famata*. Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende el epítipo de la invención. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit que comprende el epítipo de la invención para la generación de cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al kit que comprende la célula del hibridoma depositado con n° de acceso ECACC09042201, el anticuerpo monoclonal de la invención, el epítipo de la invención, o cualquiera de sus combinaciones.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra el gráfico de barras de los datos obtenidos mediante ELISA.

El eje de ordenadas representa los valores de densidad óptica de un ensayo de ELISA de captura de anticuerpos por el antígeno que en este caso son proteínas solubles secretadas por *Candida famata*. En abcisas se indican los cinco hibridomas generados. Se ensayaron los sobrenadantes (extracto soluble) de diversos hibridomas frente a proteínas fijadas de *C. famata* (CFA) y frente a BSA. A partir de estos resultados se seleccionó el hibridoma denominado como CF3 (los anticuerpos monoclonales generados por este hibridoma, también se llaman CF3, que muestran una señal de reconocimiento más alta que el resto de hibridomas en este ensayo).

Figura 2. Muestra el reconocimiento de proteínas de levadura por el anticuerpo CF3 mediante ensayo *western blot* con proteínas extraídas de diferentes especies de levaduras: *C. famata* (CFA), *C. albicans* (ALB), *C. parapsilosis* (PAR), *C. glabrata* (GLA), *Saccharomyces cerevisiae* (SAC) y *Rhodotorula mucilaginosa* (ROD).

Las proteínas obtenidas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana se incubó con el anticuerpo CF3 y se utilizó como secundario un anticuerpo anti-ratón unido a peroxidasa

para la detección indirecta de los antígenos. El anticuerpo CF3 reconoce una proteína de unos 35 kDa de *C. famata*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

5 Figura 3. Muestra un ensayo de *slot-blot* utilizando proteínas extraídas de diferentes especies de levaduras: *C. famata* (CFA), *C. albicans* (ALB), *C. parapsilosis* (PAR), *C. glabrata* (GLA), *Saccharomyces cerevisiae* (SAC) y *Rhodotorula mucilaginosa* (ROD).

10 Las proteínas obtenidas se fijaron a una membrana de nitrocelulosa mediante vacío con un aparato de slot-blot. Esta membrana se incubó con el anticuerpo CF3 y se utilizó como secundario un anticuerpo anti-ratón unido a peroxidasa para la detección indirecta de los antígenos. El anticuerpo CF3 reacciona principalmente con proteínas extraídas de *C. famata*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

15 Figura 4. Muestra un ensayo de *slot-blot* en el que se fijaron a una membrana de nitrocelulosa muestras serológicas de diferentes sujetos a diferentes diluciones.

20 Dicha membrana se incubó con el anticuerpo CF3 y se utilizó como secundario un anticuerpo anti-ratón unido a peroxidasa para la detección indirecta de los antígenos. Existen diferentes cantidades de GAPDH de *C. famata* que reaccionan con el anticuerpo en los diferentes sujetos.

25 Figura 5. Muestra un ensayo de *slot-blot* en el que se fijaron a una membrana de nitrocelulosa diferentes diluciones de muestras serológicas de un mismo sujeto obtenidas en diferentes fechas.

30 Se incubó con el anticuerpo CF3 y se utilizó como anticuerpo secundario un anti-ratón unido a peroxidasa para la detección indirecta de los antígenos. Se muestra que existen diferentes cantidades de proteína GAPDH que reacciona con el anticuerpo a lo largo del tiempo en un mismo sujeto.

35 Figura 6. Muestra el alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína GAPDH de tres especies de levadura pertenecientes al género *Candida*.

40 Las secuencias que se han utilizado en dicho alineamiento son las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1 (*Candida*) perteneciente a *Candida famata* (microorganismo también conocido como *Debaryomyces hansenii*), SEQ ID NO: 11 (*albicans*) perteneciente a *Candida albicans* con n° de acceso XP_719909.1, SEQ ID NO: 12 (*glabrata*) perteneciente a *Candida glabrata* con n° de acceso Q6FSM4.1 y SEQ ID NO: 13 (*glabrata2*) perteneciente a *Candida glabrata* con n° de acceso Q6FPW3.1.

40 Ejemplos

45 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

50 Obtención del anticuerpo monoclonal de la invención, CF3

55 De forma general, para producir anticuerpos monoclonales, primero se extraen células B del bazo de un animal que ha sido expuesto al antígeno. Estas células B son fusionadas con células tumorales de mieloma múltiple (un tipo de cáncer) que pueden crecer indefinidamente en cultivo celular. Estas células fusionadas híbridas, llamadas hibridomas pueden multiplicarse rápida e indefinidamente, puesto que son células tumorales después de todo y pueden producir gran cantidad de anticuerpos. Los hibridomas son suficientemente diluidos y cultivados para obtener un número diferente de determinadas colonias, las cuales producen sólo un tipo de anticuerpo. Los anticuerpos de diferentes colonias son analizados para conocer su capacidad de unirse a un antígeno determinado, por ejemplo con el tipo de test llamado ELISA, y para seleccionarse y aislarse de la manera más efectiva.

60 En la presente invención se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c con extractos proteicos solubles de *Candida famata* obtenidos de la siguiente forma: la levadura *C. famata* se creció hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.8. Las levaduras se centrifugaron y el medio de cultivo se liofilizó para concentrar las proteínas segregadas al medio. El liofilizado se resuspendió en PBS y se dializó frente a PBS. Después de centrifugar, este extracto proteico se dividió en alícuotas y se utilizó para inmunizar ratones, utilizando protocolos estándar de inmunización y de fusión celular (Kremer y Márquez. 2003. Methods and Protocols. Ed.: D'Ambrosio D. y Sinigaglia, F. Humana Press, Pps. 243-260).

ES 2 359 203 A1

Tras la fusión, la selección de hibridomas se realizó por ensayos de inmuno-absorción enzimática (ELISA). Como antígeno inmovilizado sobre la fase sólida se emplearon proteínas solubles de *C. famata*. En estos ensayos se utilizó el antígeno referido como tapiz específico y la proteína albúmina de suero bovino (BSA) como control negativo.

5 Como método de detección se añadió un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa seguido del sustrato de la reacción colorimétrica (detección cromogénica). De esta forma, se seleccionaron los hibridomas secretores de anticuerpos más específicos para el antígeno. La especificidad de todos los hibridomas fue evaluada mediante ensayos de ELISA (Fig. 1), *Western blot* (Fig. 2) y *slot blot* (Fig. 3) frente a extractos proteicos de otras levaduras. Como resultado de los análisis realizados se seleccionaron los mejores hibridomas entre los que destacó el
10 hibridoma CF3 (Fig. 1), depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 22 de abril de 2009 con el n° de acceso 09042201, que expresa establemente inmunoglobulinas del isotipo IgG1, correspondientes al anticuerpo monoclonal (mAb) anti-GAPDH de *C. famata* CF3.

15 La proteína detectada en los ensayos de *Western blot* fue inmunoprecipitada y analizada por MALDI-TOF, consiguiendo secuenciar 3 péptidos que correspondieron a la proteína GAPDH de la levadura *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*) con n° de acceso Q6BMK0.1.

20 Mediante los ensayos de *slot blot* (no desnaturaliza la proteína), el anticuerpo CF3 es capaz de detectar la presencia de GAPDH en el suero de personas infectadas con *C. famata*. De esta manera se está demostrando que tanto en condiciones desnaturalizantes para la proteína detectada (*Western blot*) como en condiciones no desnaturalizantes, se detecta el mismo antígeno con la sensibilidad similar, por tanto, todo parece indicar que el epítipo reconocido por el anticuerpo de la invención reconoce una secuencia de aminoácidos concreta en lugar de una determinada conformación o estructura de dicha proteína.

25 El anticuerpo CF3 no detecta la proteína GAPDH de *C. famata* en sueros de personas que no padecen infección por este microorganismo (Fig. 4). Puesto que este anticuerpo no reconoce la GAPDH de otras especies del género *Candida*, puede servir como diagnóstico diferencial de infecciones de *C. famata*.

30 Mediante la detección del anticuerpo de la invención CF3 se detecta la fluctuación de GAPDH en sueros de un paciente infectado con *C. famata* tomados a lo largo de varios años (Fig. 5), es decir, desde el 24/04/06 hasta el 07/04/08. Por lo tanto, el CF3 puede servir para seguir la evolución de la infección de *C. famata* y para detectar la eficacia de los tratamientos antifúngicos contra esta levadura, es decir, para monitorizar dicho tratamiento.

35 Para la determinación de los epítipos más probables se alinearon diversas secuencias aminoacídicas de la proteína GAPDH de los microorganismos *Candida famata*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*. Las secuencias que se han utilizado en dicho alineamiento son las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1 (*candida*) perteneciente a *Candida famata* (microorganismo también conocido como *Debaryomyces hansenii*), SEQ ID NO: 11 (*albicans*) perteneciente a *Candida albicans* con n° de acceso XP_719909.1, SEQ ID NO: 12 (*glabrata1*) perteneciente a *Candida glabrata* con n° de acceso Q6FSM4.1 y SEQ ID NO: 13 (*glabrata2*) perteneciente a *Candida glabrata* con n° de acceso Q6FPW3.1.
40

Se han seleccionado aquellas secuencias con diferencias significativas entre la secuencia de *Candida famata* SEQ ID NO: 1 y el resto de secuencias SEQ ID NO: 11-13.

45

50

55

60

65

ES 2 359 203 A1

REIVINDICACIONES

1. Célula del hibridoma depositado con nº ECACC09042201.
- 5 2. Anticuerpo monoclonal, o cualquiera de sus fragmentos, obtenido de la célula del hibridoma según la reivindicación 1, que reconoce la proteína de *Candida famata* SEQ ID NO: 1, o cualquiera de sus variantes.
- 10 3. Anticuerpo según la reivindicación 2, que reconoce una secuencia aminoacídica de dicha proteína de *Candida famata* que se selecciona de la lista de secuencias que comprende SEQ ID NO: 2 a 10, o cualquiera de sus fragmentos.
4. Antisuero aislado que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3.
- 15 5. Epítipo de la secuencia aminoacídica de *Candida famata* SEQ ID NO: 1, reconocido por el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2.
6. Epítipo según la reivindicación 5 que se selecciona de la lista de secuencias que comprende SEQ ID NO: 2 a 10, o cualquiera de sus fragmentos.
- 20 7. Método para la detección y/o cuantificación de *Candida famata* que comprende:
 - a. obtener el extracto soluble de una muestra biológica aislada,
 - b. añadir el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, al extracto soluble del apartado (a) y
 - 25 c. detectar y/o cuantificar el anticuerpo monoclonal añadido en el apartado (b) que esté unido al epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.
- 30 8. Método para la determinación de la evolución de candidiasis producida por *Candida famata* que comprende:
 - a. Determinar, según el método de la reivindicación 7, una primera concentración de *Candida famata* en una muestra biológica aislada de un individuo,
 - 35 b. determinar una segunda concentración de *Candida famata* en otra muestra biológica del individuo del apartado (a), y
 - c. comparar la segunda concentración obtenida en el apartado (b) con la primera concentración obtenida en el apartado (a) para determinar si hay o no alguna diferencia significativa.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, donde la muestra biológica aislada es un fluido biológico.
- 45 10. Método según la reivindicación 9, donde el fluido biológico es suero sanguíneo.
11. Uso del hibridoma según la reivindicación 1 para la producción del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3.
- 50 12. Uso del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 para la detección de *Candida famata*.
13. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 para la determinación de la evolución de candidiasis producida por *Candida famata*.
- 55 14. Uso del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 para detectar, cuantificar, aislar o purificar el antígeno que reconoce dicho anticuerpo.
15. Uso del epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 para la generación de cualquier anticuerpo.
- 60 16. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3.
17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, donde el anticuerpo monoclonal está conjugado a un agente antifúngico.
- 65 18. Composición farmacéutica que comprende el epítipo según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.

ES 2 359 203 A1

19. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17 que además incluye excipientes farmacéuticamente aceptables.

20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19 que además incluye otra sustancia activa.

21. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 para su uso como medicamento.

22. Epítopo según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 para su uso como medicamento.

23. Uso del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de candidiasis producida por *Candida famata*.

24. Uso del epítopo según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de candidiasis producida por *Candida famata*.

25. Kit que comprende la célula del hibridoma según la reivindicación 1.

26. Uso del kit según la reivindicación 25 para la producción del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3.

27. Kit que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3.

28. Uso del kit según la reivindicación 27 para la detección de *Candida famata*.

29. Uso del kit según la reivindicación 27 para la determinación de la evolución de candidiasis producida por *Candida famata*.

30. Kit que comprende el epítopo según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.

31. Uso del kit según la reivindicación 30 para la generación de cualquier anticuerpo.

32. Kit que comprende la célula del hibridoma según la reivindicación 1, el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, el epítopo según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, o cualquiera de sus combinaciones.

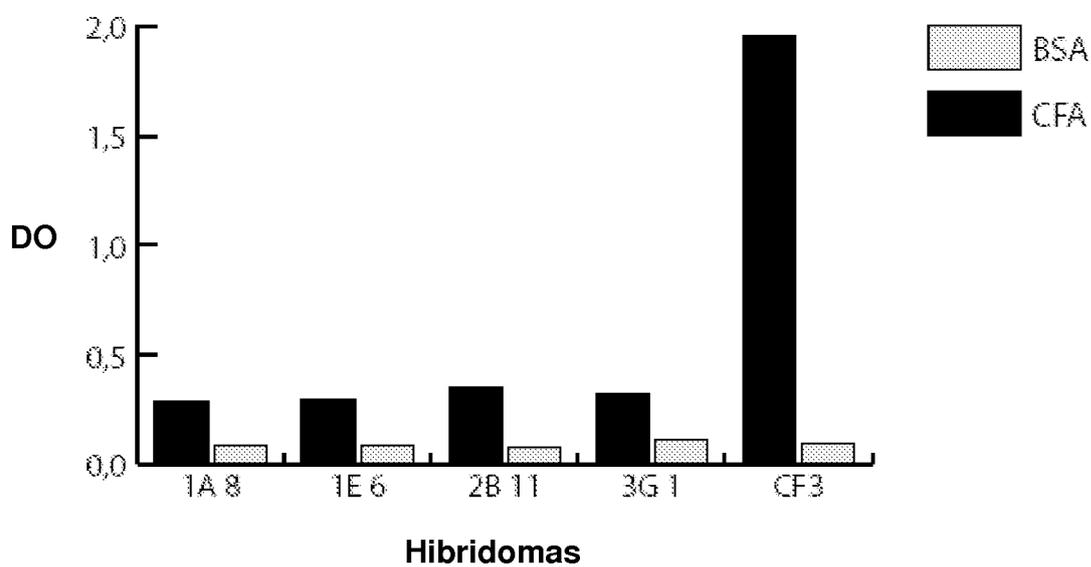


FIG. 1

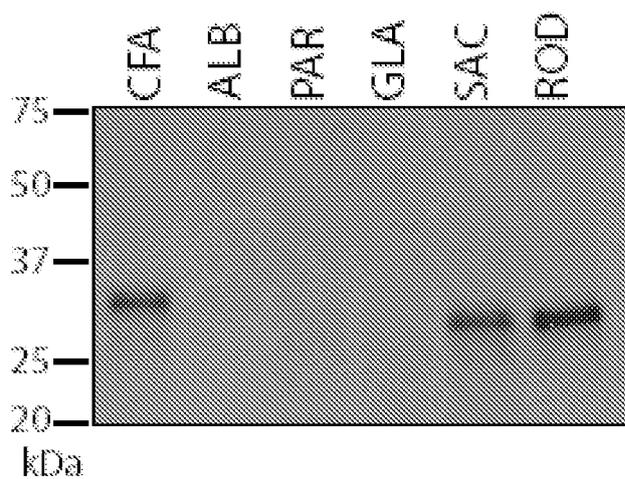


FIG. 2

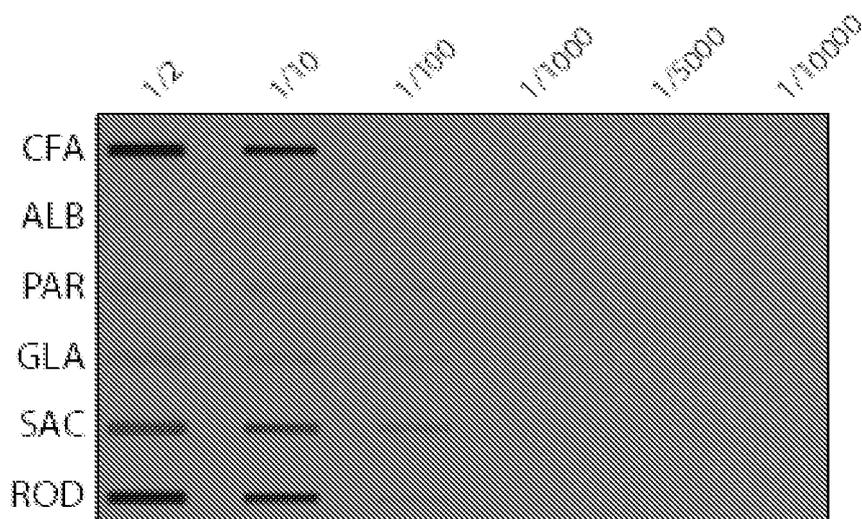


FIG. 3

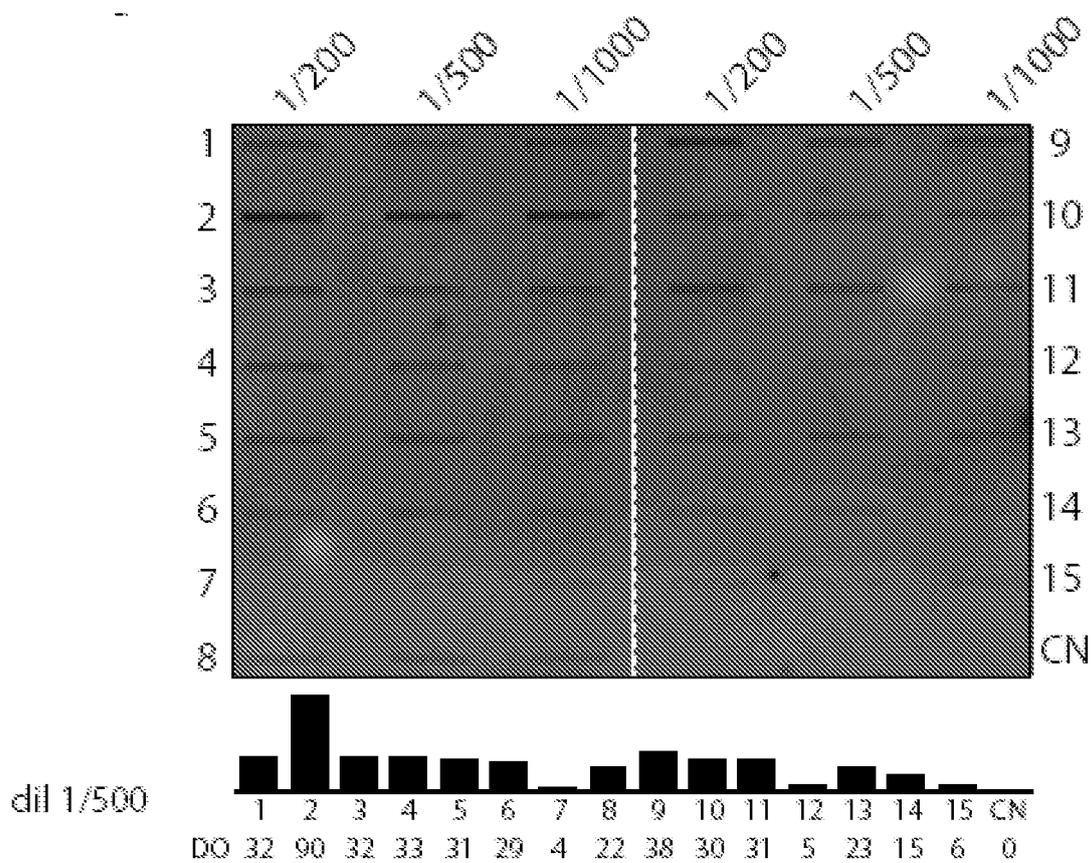


FIG. 4

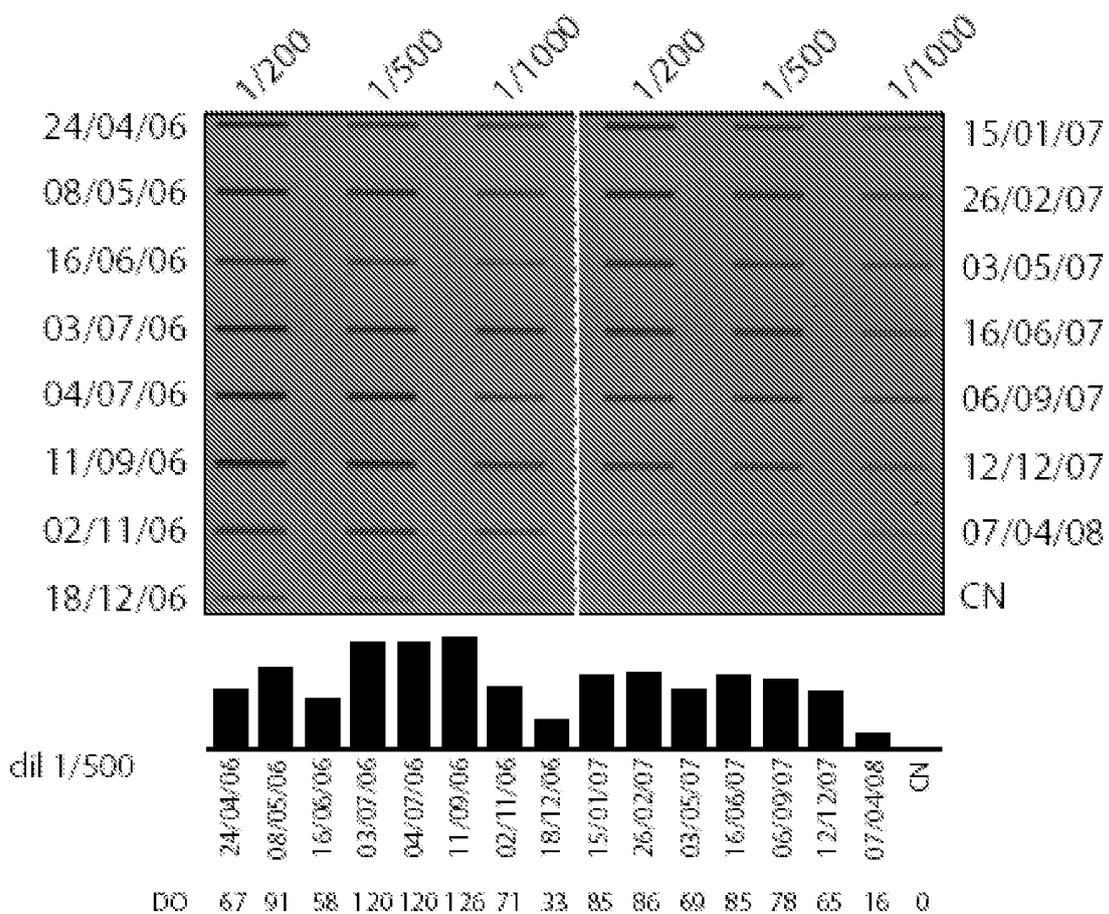


FIG. 5

ES 2 359 203 A1

```

SEQ ID NO: 12   glabrata1   -MVRVAINGFGRIGRLVLRVALSPSENIEVAVNDPFFITTDYAAAYMFKYDSTHGCRYAGEVT 59
SEQ ID NO: 13   glabrata2   -MVRVAINGFGRIGRLVLRVALSPSENIEVAVNDPFFITTDYAAAYMFKYDSTHGCRYDGEVT 59
SEQ ID NO: 1    famata       MAITIGINGFGRIGRLVLRVALSPSENIEVAVNDPFFITTDYAAAYMFKYDSTHGCRYKGEVT 60
SEQ ID NO: 11   albicans     MAIKIGINGFGRIGRLVLRVALGPKDIEVAVNDPFIAPDYAAAYMFKYDSTHGCRYKGEVT 60
                : :*****:***:* * . * .***:*****: :***** *****

SEQ ID NO: 12   glabrata1   HDEKHIIDGKKIAVHQERDFANLPWGSENIIDIAIDSTGVFKELDTAQQKHIDAGAKKVI 119
SEQ ID NO: 13   glabrata2   HDNDLIIDGKAIKVYQERDFADLFWGDNIDIVIEATGVFTAKDLAEKHIITAGAKKVI 119
SEQ ID NO: 1    famata       SKGDSLVIDGQSIKVFGEKDFASIPWGEKGVYVVIESTGVFTTEGAKKHIDGGAKKVI 120
SEQ ID NO: 11   albicans     ASGGDLVIDGHKIKVFQERDFANIPWGSQVYVVIESTGVFTNLEGACKHIDAGAKKVI 120
                ... :***: * . * :***:***. . : * :***:***. : * :*** :***:***

SEQ ID NO: 12   glabrata1   TAPSSATAPMFVVGWNEEDNYTSDLKIVSNASCTINCLAPLAKVIDEAPGIEEGLMTIVHSL 179
SEQ ID NO: 13   glabrata2   TGPSSATAPMFVVGWDDKNTSDVTVISNASCTINCLAPLAKVLQDNFGIEEALMSTVHSG 179
SEQ ID NO: 1    famata       TAPSSDAPMFVVGWNEQKNTFDLKIVSNASCTINCLAPLAKVENKFGIEEGLMTIVHSEI 180
SEQ ID NO: 11   albicans     TAPSSATAPMFVVGWNEEKYTFDLKII SNASCTINCLAPLAKVVDNFGIEEGLMTIVHSEI 180
                * . * : * * * * * : * * * : * * . : : * * * * * : * * * * * : * * * * *

SEQ ID NO: 12   glabrata1   TATQKIVDGPESHKDWREGGRTASGNIIPSSSTGAAKAVGKVLPLQLGKLTGMAFRVPTVDVS 239
SEQ ID NO: 13   glabrata2   TATQKIVDGPESHKDWREGGRTASANIIPSSSTGAAKAVTKVLPPELEGKLTGMAFRVPTVDVS 239
SEQ ID NO: 1    famata       TATQKIVDGPESHKDWREGGRTASGNIIPSSSTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMALRVPTVDVS 240
SEQ ID NO: 11   albicans     TATQKIVDGPESHKDWREGGRTASGNIIPSSSTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMALRVPTVDVS 240
                *****:*****:*****:***** * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

SEQ ID NO: 12   glabrata1   VVDLTVRLQKETTYYDEIKKVIKQASEGKLGVLGYTEDAVVSSDFLGDSSSIFDASAGI 299
SEQ ID NO: 13   glabrata2   VVDLTVRFKADVITYDEIKAAIKKASEGEMKGI LAYTEDAVVSTDFLGDTHSSIFDASAGI 299
SEQ ID NO: 1    famata       VVDLTVRLKKATYEEISEAIKAANGELKGI LGYTEDAVVSTDFLGDYSSIFDKAGI 300
SEQ ID NO: 11   albicans     VVDLTVRLKNAASYEEIIAQAIKKASEGFLKGVLYGYTEDAVVSTDFLGDSSYSSIFDQKAGI 300
                *****: * . : * : * * . * * * * : * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

SEQ ID NO: 12   glabrata1   QLSPFVKLVSWYDNEYGYSTRVVDLVEHWAKN-- 332
SEQ ID NO: 13   glabrata2   QLSPFVKLVSWYDNEYGFSARVVDMLVSKA-- 332
SEQ ID NO: 1    famata       LLSPTFVKLVSWYDNEEGYSTRVVDLLEHWAKSN 335
SEQ ID NO: 11   albicans     LLSPTFVKLVSWYDNEYGYSTRVVDLLEHWAKASA 335
                *** *****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***
    
```

FIG. 6

ES 2 359 203 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid (70%)
Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC) (30%)

5

<120> Anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína GAPDH de *Candida famata*

<130> 1595.3bis

10

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 335

<212> PRT

20

<213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 1

25

Met Ala Ile Thr Ile Gly Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Leu
1 5 10 15

30

Val Leu Arg Ile Ala Leu Gln Arg Ser Asp Ile Lys Val Val Ala Val
20 25 30

Asn Asp Pro Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys Tyr
35 40 45

35

Asp Ser Thr His Gly Arg Tyr Lys Gly Glu Val Thr Ser Lys Asp Asp
50 55 60

40

Ser Leu Val Ile Asp Gly Gln Ser Ile Lys Val Phe Gly Glu Lys Asp
65 70 75 80

45

Pro Ala Ser Ile Pro Trp Gly Lys Ala Gly Val Asp Tyr Val Ile Glu
85 90 95

Ser Thr Gly Val Phe Thr Thr Thr Glu Gly Ala Gln Lys His Ile Asp
100 105 110

50

Gly Gly Ala Lys Lys Val Ile Ile Thr Ala Pro Ser Ser Asp Ala Pro
115 120 125

55

Met Phe Val Val Gly Val Asn Glu Gln Lys Tyr Thr Pro Asp Leu Lys
130 135 140

60

Ile Val Ser Asn Ala Ser Cys Thr Thr Asn Cys Leu Ala Pro Leu Ala
145 150 155 160

Lys Val Ile Asn Asp Lys Phe Gly Ile Glu Glu Gly Leu Met Thr Thr
165 170 175

65

Val His Ser Ile Thr Ala Thr Gln Lys Thr Val Asp Gly Pro Ser His
180 185 190

ES 2 359 203 A1

Lys Asp Trp Arg Gly Gly Arg Thr Ala Ser Gly Asn Ile Ile Pro Ser
 195 200 205
 5 Ser Thr Gly Ala Ala Lys Ala Val Gly Lys Val Ile Pro Glu Leu Asn
 210 215 220
 10 Gly Lys Leu Thr Gly Met Ser Leu Arg Val Pro Thr Val Asp Val Ser
 225 230 235 240
 15 Val Val Asp Leu Thr Val Arg Leu Lys Lys Ser Ala Thr Tyr Glu Glu
 245 250 255
 20 Ile Ser Glu Ala Ile Lys Ala Ala Ser Asn Gly Glu Leu Lys Gly Ile
 260 265 270
 25 Leu Gly Tyr Thr Glu Asp Ala Val Val Ser Thr Asp Phe Leu Gly Ser
 275 280 285
 30 Asp Tyr Ser Ser Ile Phe Asp Gln Lys Ala Gly Ile Leu Leu Ser Pro
 290 295 300
 35 Thr Phe Val Lys Leu Ile Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Phe Gly Tyr Ser
 305 310 315 320
 Thr Arg Val Val Asp Leu Leu Glu His Val Ala Lys Ala Ser Asn
 325 330 335

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 2

Ile Ala Leu Gln Arg Ser Asp Ile Lys Val Val Ala Val Asn Asp Pro
 1 5 10 15

Phe Ile Ala Pro Glu
 20

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> *Debaryomyces hansenii*

ES 2 359 203 A1

<400> 3

5 Ser Lys Asp Asp Ser Leu Val Ile Asp Gly Gln Ser Ile Lys Val Phe
1 5 10 15

10 Gly Glu Lys Asp Pro Ala Ser Ile Pro Trp Gly Lys Ala
20 25

<210> 4

<211> 12

15 <212> PRT

<213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 4

20 Thr Thr Thr Glu Gly Ala Gln Lys His Ile Asp Gly
1 5 10

25

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

30 <213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 5

35 Ala Pro Ser Ser Asp
1 5

40 <210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> *Debaryomyces hansenii*

45

<400> 6

50 Glu Gln Lys Tyr Thr Pro Asp Leu Lys Ile Val
1 5 10

<210> 7

55 <211> 4

<212> PRT

<213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 7

60

Ile Asn Asp Lys
1

65

<210> 8

<211> 22

ES 2 359 203 A1

<212> PRT

<213> *Debaryomyces hansenii*

5 <400> 8

Ser Ala Thr Tyr Glu Glu Ile Ser Glu Ala Ile Lys Ala Ala Ser Asn
1 5 10 15

10

Gly Glu Leu Lys Gly Ile
20

15

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

20

<213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 9

25

Asp Tyr Ser Ser Ile Phe Asp Gln
1 5

30 <210> 10

<211> 4

<212> PRT

35

<213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 10

40

Glu Phe Gly Tyr
1

<210> 11

45

<211> 335

<212> PRT

<213> *Candida albicans*

50

55

60

65

ES 2 359 203 A1

<400> 11

5	Met 1	Ala	Ile	Lys	Ile 5	Gly	Ile	Asn	Gly	Phe 10	Gly	Arg	Ile	Gly	Arg 15	Leu
10	Val	Leu	Arg	Val 20	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys 25	Asp	Ile	Glu	Val	Val 30	Ala	Val
15	Asn	Asp	Pro 35	Phe	Ile	Ala	Pro	Asp 40	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Met 45	Phe	Lys	Tyr
20	Asp	Ser 50	Thr	His	Gly	Arg	Tyr 55	Lys	Gly	Glu	Val	Thr 60	Ala	Ser	Gly	Asp
25	Asp 65	Leu	Val	Ile	Asp	Gly 70	His	Lys	Ile	Lys	Val 75	Phe	Gln	Glu	Arg	Asp 80
30	Pro	Ala	Asn	Ile	Pro 85	Trp	Gly	Lys	Ser	Gly 90	Val	Asp	Tyr	Val	Ile 95	Glu
35	Ser	Thr	Gly	Val 100	Phe	Thr	Lys	Leu	Glu 105	Gly	Ala	Gln	Lys	His 110	Ile	Asp
40	Ala	Gly	Ala 115	Lys	Lys	Val	Ile	Ile 120	Thr	Ala	Pro	Ser	Ala 125	Asp	Ala	Pro
45	Met	Phe 130	Val	Val	Gly	Val	Asn 135	Glu	Asp	Lys	Tyr	Thr 140	Pro	Asp	Leu	Lys
50	Ile 145	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser 150	Cys	Thr	Thr	Asn	Cys 155	Leu	Ala	Pro	Leu	Ala 160
55	Lys	Val	Val	Asn	Asp 165	Thr	Phe	Gly	Ile	Glu 170	Glu	Gly	Leu	Met	Thr 175	Thr
60	Val	His	Ser	Ile 180	Thr	Ala	Thr	Gln	Lys 185	Thr	Val	Asp	Gly	Pro 190	Ser	His
65	Lys	Asp	Trp 195	Arg	Gly	Gly	Arg	Thr 200	Ala	Ser	Gly	Asn	Ile 205	Ile	Pro	Ser
70	Ser	Thr	Gly	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Gly	Lys	Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Asn

ES 2 359 203 A1

210 215 220

5 Gly Lys Leu Thr Gly Met Ser Leu Arg Val Pro Thr Thr Asp Val Ser
225 230 235 240

10 Val Val Asp Leu Thr Val Arg Leu Lys Lys Ala Ala Ser Tyr Glu Glu
245 250 255

15 Ile Ala Gln Ala Ile Lys Lys Ala Ser Glu Gly Pro Leu Lys Gly Val
260 265 270

20 Leu Gly Tyr Thr Glu Asp Ala Val Val Ser Thr Asp Phe Leu Gly Ser
275 280 285

25 Ser Tyr Ser Ser Ile Phe Asp Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu Ser Pro
290 295 300

30 Thr Phe Val Lys Leu Ile Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Tyr Gly Tyr Ser
305 310 315 320

35 Thr Arg Val Val Asp Leu Leu Glu His Val Ala Lys Ala Ser Ala
325 330 335

30 <210> 12
<211> 332
<212> PRT
<213> *Candida glabrata*

40 Met Val Arg Ile Ala Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Leu Val
1 5 10 15

45 Leu Arg Val Ala Leu Ser Arg Ser Asn Ile Glu Val Val Ala Val Asn
20 25 30

50 Asp Pro Phe Ile Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys Tyr Asp
35 40 45

55 Ser Thr His Gly Arg Tyr Ala Gly Glu Val Thr His Asp Asp Lys His
50 55 60

60 Ile Ile Ile Asp Gly Lys Lys Ile Ala Val His Gln Glu Arg Asp Pro
65 70 75 80

65 Ala Asn Leu Pro Trp Gly Ser Glu Asn Ile Asp Ile Ala Ile Asp Ser
85 90 95

70 Thr Gly Val Phe Lys Glu Leu Asp Thr Ala Gln Lys His Ile Asp Ala
100 105 110

75 Gly Ala Lys Lys Val Val Ile Thr Ala Pro Ser Ser Thr Ala Pro Met
115 120 125

ES 2 359 203 A1

Phe Val Val Gly Val Asn Glu Asp Lys Tyr Thr Ser Asp Leu Lys Ile
 130 135 140

5 Val Ser Asn Ala Ser Cys Thr Thr Asn Cys Leu Ala Pro Leu Ala Lys
 145 150 155 160

10 Val Ile Asp Glu Ala Phe Gly Ile Glu Glu Gly Leu Met Thr Thr Val
 165 170 175

15 His Ser Leu Thr Ala Thr Gln Lys Thr Val Asp Gly Pro Ser His Lys
 180 185 190

20 Asp Trp Arg Gly Gly Arg Thr Ala Ser Gly Asn Ile Ile Pro Ser Ser
 195 200 205

25 Thr Gly Ala Ala Lys Ala Val Gly Lys Val Leu Pro Gln Leu Gln Gly
 210 215 220

30 Lys Leu Thr Gly Met Ala Phe Arg Val Pro Thr Val Asp Val Ser Val
 225 230 235 240

35 Val Asp Leu Thr Val Lys Leu Gln Lys Glu Thr Thr Tyr Asp Glu Ile
 245 250 255

40 Lys Lys Val Ile Lys Gln Ala Ser Glu Gly Lys Leu Lys Gly Val Leu
 260 265 270

45 Gly Tyr Thr Glu Asp Ala Val Val Ser Ser Asp Phe Leu Gly Asp Ser
 275 280 285

50 Arg Ser Ser Ile Phe Asp Ala Ser Ala Gly Ile Gln Leu Ser Pro Lys
 290 295 300

55 Phe Val Lys Leu Val Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Tyr Gly Tyr Ser Thr
 305 310 315 320

Arg Val Val Asp Leu Val Glu His Val Ala Lys Asn
 325 330

60 <210> 13
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> *Candida glabrata*
 <400> 13

65 Met Val Arg Val Ala Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Ile Val
 1 5 10 15

Leu Arg Ile Ala Met Lys Arg Asp Gly Ile Asp Val Val Ala Ile Asn
 20 25 30

Asp Pro Phe Ile Thr Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys Tyr Asp

ES 2 359 203 A1

	35		40		45											
5	Ser	Thr 50	His	Gly	Arg	Tyr	Asp 55	Gly	Glu	Val	Thr	His 60	Asp	Asp	Lys	Asp
	Leu	Ile	Ile	Asp	Gly	Lys 70	Ala	Ile	Lys	Cys	Tyr 75	Gln	Glu	Arg	Asp	Pro 80
10	Ala	Asp	Leu	Pro	Trp 85	Gly	Asp	Asn	Asp	Ile 90	Asp	Ile	Val	Ile	Glu 95	Ala
15	Thr	Gly	Val	Phe 100	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu 105	Ala	Glu	Lys	His	Ile 110	Thr	Ala
20	Gly	Ala	Lys 115	Lys	Val	Val	Ile	Thr 120	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr 125	Ala	Pro	Met
	Phe	Val 130	Lys	Gly	Val	Asn	Asp 135	Asp	Lys	Tyr	Thr	Ser 140	Asp	Val	Thr	Val
25	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Cys 150	Thr	Thr	Asn	Cys	Leu 155	Ala	Pro	Leu	Ala	Lys 160
30	Val	Leu	Gln	Asp	Asn 165	Phe	Gly	Ile	Glu	Glu 170	Ala	Leu	Met	Ser	Thr 175	Val
35	His	Ser	Gln	Thr 180	Ala	Thr	Gln	Lys	Thr 185	Val	Asp	Gly	Pro	Ser 190	Lys	Lys
40	Asp	Trp	Arg 195	Gly	Gly	Arg	Thr	Ala 200	Ser	Ala	Asn	Ile	Ile 205	Pro	Ser	Ser
45	Thr	Gly 210	Ala	Ala	Lys	Ala	Val 215	Thr	Lys	Val	Leu	Pro 220	Glu	Leu	Glu	Gly
50	Lys	Leu	Thr	Gly	Met	Ala 230	Phe	Arg	Val	Pro	Thr 235	Val	Asp	Val	Ser	Val 240
55	Val	Asp	Leu	Thr	Val 245	Arg	Phe	Ala	Lys	Asp 250	Val	Thr	Tyr	Asp	Glu 255	Ile
60	Lys	Ala	Ala	Ile 260	Lys	Lys	Ala	Ser	Glu 265	Gly	Glu	Met	Lys	Gly 270	Ile	Leu
65	Ala	Tyr	Thr 275	Glu	Asp	Ala	Val	Val 280	Ser	Thr	Asp	Phe	Leu 285	Gly	Asp	Thr
	His	Ser 290	Ser	Ile	Phe	Asp	Ala 295	Ser	Ala	Gly	Ile	Gln 300	Leu	Ser	Pro	Arg
	Phe	Val	Lys	Leu	Val	Ser 310	Trp	Tyr	Asp	Asn	Glu 315	Tyr	Gly	Phe	Ser	Ala 320
	Arg	Val	Val	Asp	Met 325	Val	Glu	Leu	Val	Ser 330	Lys	Ala				



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930969

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.11.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YIJIANG LU et al. "A carbón nanotube sensor array for sensitive gas discrimination using principal component analysis" Journal of Electroanalytical Chemistry, 05.06.2006, Volumen 593 Páginas 105-110; apartados 1, 2 y 3.	1-14
A	IONESCU, R. et al. "Novel hybrid materials for gas sensing applications made of metal-decorated MWCNTs dispersed on nano-particle metal oxides" Sensors and Actuators B, 31.12.2007, Volumen 131 Páginas 174-182; apartados 1, 2 y 3.3.	1-14
A	LEGHRIB, R. et al. "Gas sensing properties of MWCNTs decorated with gold or tin oxide nanoparticles" Procedia Chemistry, 01.09.2009, Volumen 1 Páginas 168-171, apartados 2, 3.1, 3.3 y 5.	1,9
A	EP 1884770 A1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO LTD) 06.02.2008, párrafos 8,13,21,25-26,29.	1,9
A	BONDAVALLI, P. et al. "Carbon nanotubes based transistors as gas sensors: State of the art and critical review" Sensors and Actuators B, 03.05.2009, Volumen 140 Páginas 304-318; apartados 1,3,4 y 5.	1,9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.02.2011

Examinador
A. Urrecha Espluga

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N27/12 (01.01.2006)

C01B31/02 (01.01.2006)

B82Y15/00 (01.01.2011)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C01B, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	YIJIANG LU et al. "A carbón nanotube sensor array for sensitive gas discrimination using principal component analysis" Journal of Electroanalytical Chemistry, 05.06.2006, Volumen 593 Páginas 105-110; apartados 1, 2 y 3.	
D02	IONESCU, R. et al. "Novel hybrid materials for gas sensing applications made of metal-decorated MWCNTs dispersed on nano-particle metal oxides" Sensors and Actuators B, 31.12.2007, Volumen 131 Páginas 174-182; apartados 1, 2 y 3.3.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un dispositivo para la detección selectiva de gas benceno, un procedimiento para la obtención de dicho dispositivo, y un procedimiento para la detección de benceno utilizándolo.

El documento D01 divulga un dispositivo para la detección selectiva de gases, entre ellos benceno en cantidades del orden de ppm, que comprende en un sustrato base de silicio una combinación de sensores de SWCNT funcionalizados y algunos de ellos decorados con clústers de metales (Pd ó Au), también comprende el sustrato base electrodos interdigitados metálicos de platino para medir variaciones de la resistencia de dichos sensores (apartados 1, 2 y 3).

El documento D02 divulga un procedimiento la obtención de sensores para gases, dichos dispositivos comprenden MWCNTs decorados con clústers de partículas metálicas dispersos en nanopartículas de óxidos metálicos. El procedimiento comprende la funcionalización de los MWCNTs con plasma frío y la decoración de los mismos con clústers metálicos (Au ó Ag) mediante evaporación térmica (apartados 1,2 y 3.3).

Ninguno de los documentos citados, ni ninguna combinación relevante de los mismos, divulga un dispositivo para la detección selectiva de benceno a niveles de partes por billón que comprenda en un sustrato base: por lo menos un sensor de SWCNT ó MWCNT funcionalizado y decorado con clústers de rodio, por lo menos un sensor de SWCNT ó MWCNT funcionalizado y decorado con clústers de oro, paladio, níquel y titanio, y/o no decorados, donde dicho sustrato comprende además electrodos interdigitados metálicos para medir la variación de la resistencia de dichos sensores. Tampoco aparece divulgado un dispositivo en el que además de los sensores anteriores se incorpora por lo menos un sensor de SWCNT ó MWCNT funcionalizado y decorado con clústers de platino, de forma que la detección de benceno pueda ser cuantitativa.

Por tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-14 es nuevo e implica actividad inventiva (Art 6 y 8LP).