



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 240**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04718644 .0**

96 Fecha de presentación : **09.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1603941**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54 Título: **Inhibidores de la HSP90 extracelular.**

30 Prioridad: **12.03.2003 US 454813**
03.07.2003 EP 03015115

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2011

73 Titular/es: **Tufts University**
Ballou Hall
Medford, Massachusetts 02155, US

72 Inventor/es: **Jay, Daniel G.;**
Eustace, Brenda K. y
Sakurai, Takashi

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 359 240 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

Inhibidores de la HSP90 extracelular

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los tumores malignos desprenden células, que migran a nuevos tejidos y generan tumores secundarios. El proceso de generación de tumores secundarios se denomina metástasis, proceso complejo en el cual las células tumorales colonizan lugares distantes del tumor primario. Liotta ((1986) Cancer Res. 46, 1-7) ha propuesto una hipótesis en tres etapas para el proceso de formación de metástasis: La primera etapa es la adherencia de la célula tumoral a través de los receptores de la superficie celular. A continuación, la célula tumoral anclada segrega enzimas, que pueden degradar localmente la matriz. Lo más probable es que la lisis de la matriz tenga lugar en una región altamente localizada cercana a la superficie de la célula tumoral. La tercera etapa es el desplazamiento de la célula tumoral al interior de la región de la matriz modificada mediante proteólisis. Así, la invasión de la matriz no se debe simplemente a la presión debida al crecimiento pasivo si no que necesita de mecanismos bioquímicos activos. La degradación del tejido normal circundante es una característica central de la capacidad invasora de los tumores malignos. El proceso de formación de metástasis depende de la capacidad invasora de las células tumorales. Por lo tanto, sería útil desarrollar fármacos que inhiban la capacidad invasora y, de este modo, eviten las metástasis de los tumores primarios.

20 Recientemente, la investigación se ha centrado en la identificación de proteínas específicas involucradas en las metástasis, que pueden utilizarse como base para un mejor diagnóstico o para estrategias terapéuticas mejoradas. Una de las proteínas que se ha identificado como una molécula chaperona molecular y que es esencial para la estabilidad y función de diversas proteínas oncogénicas es la proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Este nombre es un término genérico utilizado para describir dos isoformas denominadas Hsp90 α y β . La estructura y función de las isoformas de Hsp90 se describe en Csermely y otros: Pharmacol. Ther. Vol. 79, 1998, n^o. 2, The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review ("La familia de chaperonas moleculares de 90 kDa: Estructura función y aplicaciones clínicas. Una revisión completa"), p. 131, p. 25 146. Hsp90 es una de las chaperonas más abundantes en el citoplasma de las células eucariotas y constituye aproximadamente entre el 1 y el 2% de todas las proteínas de la célula. Las funciones intracelulares de Hsp90 incluyen la estabilización de proteínas (receptores esteroideos) y la maduración de proteínas como las quinasas y otras proteínas de señalización. Hsp90 se ha implicado, sin embargo, en una amplia variedad de funciones incluyendo la estabilidad evolutiva de proteínas mutadas, reordenamientos del citoesqueleto, transporte nuclear, proliferación celular y apoptosis, degradación de proteínas, presentación de antígenos y reconocimiento de liposacáridos. Siendo muy abundante en la célula, Hsp90 también se ha relacionado con muchas enfermedades, desde el cáncer a las enfermedades autoinmunes y las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal frente al epítipo dominante inmunológicamente LKVIRK de Hsp90 ha demostrado actividad terapéutica en un tratamiento contra las infecciones fúngicas y se ha utilizado en un ensayo clínico de la compañía Neutec bajo el nombre comercial de Mycogrip®.

40 También se ha demostrado que Hsp90 es secretada por las células en respuesta al estrés (Liao y otros (2000) J. Biol. Chem. 275, 189-96), pero no se ha asociado ninguna función con esta secreción.

45 Mientras que Hsp90 posee unas funciones intracelulares bien establecidas, las notificaciones sobre la existencia de Hsp90 extracelular y su función son escasas. Se ha observado que Hsp90 es un presentador efectivo de péptidos antigénicos a receptores de células presentadoras de antígenos. También se ha observado que es una de las cuatro proteínas asociadas con las balsas lipídicas en la superficie extracelular de las células, que se unen al lipopolisacárido e inician las respuestas intracelulares (Triantafilou y otros (2002) Trends in Immunology 23, 301-4). También se ha observado que Hsp90 se sobre-expresa en la superficie de algunas células tumorales: líneas celulares de microcitomas, melanoma y hepatoma (Ferrarini y otros (1992) Int. J. Cancer 51, 613-19). Existe la hipótesis de que la expresión de Hsp90 sobre la superficie de estas líneas celulares está relacionada a la presentación de antígenos, aunque todavía no existen evidencias claras.

55 En la actualidad también se está evaluando Hsp90 como diana intracelular en el desarrollo de fármacos contra el cáncer, debido a su participación en la regulación de diversas vías de señalización importantes en la determinación del fenotipo de un tumor. Se ha demostrado que la inhibición de la función de Hsp90 provoca una degradación selectiva de proteínas de señalización involucradas en la proliferación celular, regulación del ciclo celular y la apoptosis. Recientemente, se ha demostrado que diversos antibióticos conocidos (por ejemplo, la geldanamicina, el radicicol y la coumermicina A1) son inhibidores de la Hsp90, describiéndose en WO 00/53169. En este documento se propone un método de inhibición de la unión de una proteína chaperona a su cliente, proponiendo dicho método poner en contacto una chaperona con coumarina o un derivado de la coumarina. Sin embargo, las enseñanzas de WO 00/53169 se dirigen meramente a la inhibición de la proteína Hsp90 intracelular.

65 En la actualidad ya se están evaluando en ensayos clínicos inhibidores tales como el análogo de la geldanamicina 17-AAG, pero hay preocupación sobre la toxicidad debida a la inhibición no específica de la proteína a lo largo de

todos los compartimentos celulares (Dunn (2002) J. Natl. Cancer Inst 94, 1194-5). Además, la falta de comprensión de la interacción de Hsp90 con proteínas cliente en diversos procesos de señalización celular supone riesgos potenciales de la inhibición de la Hsp90 intracelular con inhibidores tóxicos.

5 La determinación del papel fisiológico de una proteína es un prerrequisito para decidir si la interferencia con la función de esta proteína puede ser una posible vía para el tratamiento de una enfermedad o no. Debe tenerse en cuenta que en una situación fisiológica, es decir, en una célula tumoral de un paciente, Hsp90 actúa conjuntamente con otras proteínas, que pueden modular e interferir entre sí. Es la interacción funcional entre Hsp90 y las proteínas con las que interactúa la que determina su papel fisiológico.

10 También se ha notificado que Hsp90 actúa como una chaperona molecular en el transporte de proteínas transmembrana en el núcleo (Schlatter y otros (2002) Biochem. J. 362, 675-84) y se ha implicado en el flujo de salida de fármacos en las células de leucemia y de carcinoma de pulmón y ovario (Rappa y otros (2002) Oncol. Res. 12, 113-9 y Rappa, y otros (2000) Anticancer Drug Des 15, 127-34).

15 La presente invención demuestra por primera vez que la inhibición de la Hsp90 extracelular produce una reducción de la capacidad invasora de las células tumorales. La presente invención muestra una nueva vía para inhibir la Hsp90 extracelular mediante la cual pueden evitarse los efectos secundarios asociados con el ataque a la Hsp90 intracelular.

20 La presente invención también muestra una interrelación entre la inhibición de la Hsp90 y la secreción de metaloproteasas de la matriz (MMPs). Las MMPs actúan en la invasión digiriendo la matriz extracelular colindante, lo que permite que las células migren a través de los tejidos densos. Nuestros resultados han demostrado que la Hsp90 es un elemento crítico para la invasión de las células cancerosas incrementando la secreción o actividad de las MMPs, que cuando se sobreexpresa en células de fibrosarcoma. Hemos demostrado además que la invasión dependiente de Hsp90 puede ser inhibida utilizando las moléculas de la presente invención.

25 La presente invención se refiere a la utilización de moléculas que interfieren con la función de la Hsp90 extracelular en células tumorales para el tratamiento de cánceres específicos. Se dan a conocer compuestos, composiciones y métodos útiles para disminuir o inhibir la capacidad invasora y/o el potencial metastásico de células tumorales específicas. Además, se da a conocer un método que permite determinar si una célula tumoral es dependiente de una Hsp90 extracelular funcional para su capacidad invasora y/o su potencial metastásico.

30

RESUMEN DE LA INVENCION

35 La presente invención queda definida en y por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a moléculas, que pueden unirse específicamente a la Hsp90 extracelular. Además, las moléculas de la presente invención pueden marcarse, si se desea, con grupos detectables o pueden ser parte de un conjugado biológico.

40 La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la Hsp90 extracelular.

45 En una realización adicional, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican inhibidores de la Hsp90 extracelular, si los inhibidores se seleccionan de un grupo formado por polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, así como a vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos y a células huésped que comprenden dichos vectores.

50 En una realización adicional, la presente invención se refiere a la utilización de moléculas que inhiben la función de la Hsp90 extracelular para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la invasión y/o del potencial metastásico de células cancerosas.

55 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de la invasión y/o del potencial metastásico de células en un paciente, comprendiendo dicho método la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de las moléculas, y/o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para determinar la dependencia de la capacidad invasora de una célula cancerosa de la funcionalidad de la Hsp90 extracelular.

60 En una realización adicional, la presente invención hace referencia a un método para la identificación de moléculas útiles para inhibir la capacidad invasora de una célula cancerosa, particularmente para la identificación de ligandos que se unen a Hsp90.

65 En una realización adicional, la presente invención se refiere a la utilización de clases de moléculas para disminuir la actividad de la metaloproteasa de matriz (MMP).

DEFINICIONES

- 5 Tal como se utilizan en la presente invención, se aplicaran las definiciones siguientes a no ser que se indique lo contrario.
- 10 Tal como se utiliza en la presente invención, un "polipéptido" es una molécula que comprende más de 10, preferentemente más de 20, más preferentemente más de 30, y menos de 10.000, más preferentemente menos de 2.500 y más preferentemente menos de 1.000 aminoácidos. También se incluyen polipéptidos que contienen aminoácidos modificados o no naturales.
- 15 Tal como se utilizan en la presente invención, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" hacen referencia a cualquier agente de unión inmunológico, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de estas clases se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares.
- 20 Los anticuerpos también pueden seleccionarse a partir de inmunoglobulinas modificadas, por ejemplo anticuerpos producidos mediante métodos químicos o recombinantes, anticuerpos injertados en una CDR o anticuerpos humanizados, anticuerpos mutados en un sitio específico que muestran una identidad en su secuencia de aminoácidos en sus regiones CDR, particularmente en su región CDR3, con los fragmentos de anticuerpo correspondientes de la presente invención y que mantienen substancialmente la misma afinidad de unión a Hsp90 que los fragmentos de anticuerpo correspondientes.
- 25 Las CDRs (región determinante de complementariedad) de un anticuerpo son las partes de dichas moléculas que determinan su especificidad y entran en contacto con los ligandos específicos. Las CDRs son las partes más variables de la molécula y contribuyen a la diversidad de las mismas.
- 30 Tal como se utiliza en la presente invención, identidad substancial en la secuencia de aminoácidos significa que al menos un 70%, preferentemente al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, más preferentemente todos menos 5, aún más preferentemente todos menos 3 e incluso más preferentemente todos menos 1 de los aminoácidos de dos secuencias alineadas de aminoácidos, particularmente de CDRs alineadas, son idénticos.
- 35 El término "fragmento de anticuerpo" se utiliza para referirse a cualquier fragmento de una molécula similar a un anticuerpo que posee una región de unión a antígenos, incluyendo dicho término fragmentos de anticuerpo tales como scFv, dsFv, Fab', Fab, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (DABs), diacuerpos, y similares. Las técnicas para la preparación y utilización de diversos constructos y fragmentos basados en anticuerpos son bien conocidas en la técnica (ver Kabat y otros (1991) J. Immunol. 147, 1709-19), que se incorpora específicamente a la presente invención como referencia.
- 40 Los fragmentos de anticuerpo "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, presentándose dichos dominios en una cadena polipeptídica única. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un conector de polipéptidos entre los dominios VH y VL del anticuerpo que permite que el scFv adopte la estructura deseada para la unión a antígenos.
- 45 Un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo más pequeño que retiene un lugar de unión a antígenos intacto.
- Un "dsFv" es un Fv estabilizado mediante puentes bisulfuro.
- 50 Un fragmento "Fab" es un fragmento de unión a antígenos, que contiene cadenas ligeras completas apareadas con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada.
- Un fragmento "Fab" es un fragmento F(ab')₂ reducido.
- 55 Un fragmento "F(ab')₂" es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente bisulfuro en la región bisagra.
- 60 Un "anticuerpo de dominio único (DAB)" es un anticuerpo con solo una cadena proteica (en lugar de dos) derivada de sólo uno de los dominios de la estructura del anticuerpo. Los DABs explotan el hecho de que, en algunos anticuerpos, la mitad de la molécula del anticuerpo se une a su antígeno diana casi tan bien como la molécula completa (Davies y otros (1996) Protein Eng. 9: 531-537).
- 65 Los "diacuerpos" son anticuerpos bivalentes o de doble especificidad en los cuales los dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica única, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a que los dominios se

emparejen con dominios complementarios de otra cadena, creándose sitios de unión para dos antígenos (Holliger y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448).

5 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “bioconjugado” significa un inhibidor de la Hsp90 extracelular que se une covalentemente o no covalentemente a y/o se acopla con, respectivamente, otra proteína, una matriz sólida (por ejemplo, una perla), con sí misma formando multímeros, un agente citotóxico que incrementa adicionalmente la toxicidad contra las células diana, un agente citostático, un profármaco o una molécula efectora, que es capaz de modificar la célula que expresa Hsp90 o atraer células inmunitarias.

10 Los términos “marcador” o “marcado” hacen referencia respectivamente a un marcador detectable o a la incorporación del mismo, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido marcado radioactivamente o unido a un fluoróforo o a un cromóforo o la unión de un fluoróforo, un cromóforo o un marcador radioactivo a un ligando o la unión de grupos que pueden detectarse mediante una segunda molécula marcada que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que pueden detectarse mediante un método óptico o colorimétrico.
15 Un ejemplo de dicho sistema de detección en dos etapas es el bien conocido sistema biotina-avidina. En la técnica se conocen diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas (ver, por ejemplo, Lobl y otros (1988) Anal. Biochem., 170, 502-511) y pueden aplicarse para diferentes clases de moléculas.

20 Un “epítipo” incluye cualquier proteína determinante capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o a un fragmento de anticuerpo. Los determinantes epitópicos están formados habitualmente por agrupaciones de moléculas superficiales químicamente activas tales como aminoácidos expuestos, amino-azúcares, u otras cadenas laterales de carbohidratos y habitualmente poseen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga.

25 Tal como se utiliza en la presente invención “tratamiento de tumores metastásicos” o “tratamiento de micrometástasis” significa que se estabilizan, previenen, retrasan o inhiben las metástasis de un tumor mediante la molécula de la presente invención, ya sea como medicamento único o en combinación con otros medicamentos. Enfermedad estable o “sin cambios” (NC) es una descripción de la evolución de la enfermedad ya sea sin cambios en las metástasis o con una reducción inferior al 50% o un incremento inferior al 25% durante un período de al menos 4 semanas. Prevención puede ser, por ejemplo, que no se detectan nuevas metástasis tras el inicio del tratamiento. Ello puede provocar un incremento entre dos y tres veces en la mediana y/o en el % anual de supervivencia de los pacientes tratados en comparación con los pacientes no tratados. Un retraso puede significar un período de al menos 8 semanas, 3 meses, 6 meses o incluso un año en el cual no se detectan nuevas metástasis tras el inicio del tratamiento. Inhibición significa que el tamaño medio o el número total de nuevas metástasis es al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o incluso un 90% inferior en el grupo tratado con la molécula de la invención en comparación con un grupo no tratado. El número, tamaño y prevalencia de metástasis puede ser detectado por los facultativos expertos en el campo de la oncología siguiendo la práctica y los procedimientos generalmente aceptados para la detección de metástasis, por ejemplo, como se describe en Harrison's Principles of Internal Medicine (Bases de medicina interna de Harrison) 15^a ed. 2001 Mc Graw Hill.

40 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “tumores metastásicos” incluye tanto tumores en el lugar primario capaces de generar metástasis como tumores que han generado metástasis en lugares secundarios.

45 Una “micrometástasis” es una acumulación de células tumorales con un tamaño inferior a los 2 mm, que habitualmente sólo pueden detectarse mediante métodos histológicos.

50 Tal como se utiliza en la presente invención, la “capacidad invasora” es la capacidad de una célula para migrar a través de una capa de otras células o de migrar a través de la matriz extracelular. La capacidad invasora puede evaluarse mediante el ensayo Matrigel descrito en los ejemplos. La invasión se mide como el porcentaje de células que alcanza la superficie inferior del filtro durante un determinado período de incubación.

55 Tal como se utiliza en la presente invención el “potencial metastásico” es la capacidad de una célula tumoral de formar un nuevo tumor en un lugar distante del tumor primario del cual deriva la célula tumoral (una metástasis). “Cantidades terapéuticamente efectivas” son cantidades que eliminan o disminuyen la carga tumoral de un paciente, o que previenen, retrasan o inhiben las metástasis. La dosificación dependerá de diversos parámetros, entre los que se incluyen el tipo de tumor, la historia de del paciente, el estado del paciente, el posible uso concomitante de agentes citotóxicos y los métodos de administración. Entre los métodos de administración se incluyen la inyección (por ejemplo, parenteral, subcutánea, endovenosa, intraperitoneal, etc.), para los cuales la molécula que inhibe la función de la Hsp90 extracelular se proporciona con un vehículo no tóxico aceptable farmacéuticamente. En general, los vehículos y diluyentes adecuados se seleccionan de manera que no perjudique significativamente la actividad biológica del agente de unión (por ejemplo, la especificidad de unión, la afinidad o la estabilidad), tales como agua, suero fisiológico, solución de Ringer, solución de dextrosa, albumina sérica humana al 5%, aceites fijados, etiloleato o liposomas.). Como vehículos aceptables pueden incluir sales, agentes tampón, oligo o polisacáridos, polímeros, compuestos viscoelásticos como el ácido hialurónico, agentes potenciadores de la viscosidad, conservantes, y similares, biocompatibles, inertes o bioabsorbibles. Además la composición o formulación farmacéutica también

puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunógenos y similares. Las dosis típicas pueden oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 20 mg/kg, o más particularmente entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg.

5 Los métodos terapéuticos que emplean moléculas inhibitoras de la función de Hsp90 pueden combinarse con quimioterapia, cirugía y radioterapia, dependiendo del tipo de tumor, el estado del paciente, otros aspectos sanitarios y una diversidad de factores. Las moléculas inhibitoras de la función de Hsp90 también pueden utilizarse como medicamento único efectivo de una composición terapéutica.

10 Una "molécula inhibidora de la Hsp90 extracelular", es una molécula que provoca una inhibición de la actividad biológica de la Hsp90 extracelular. Esta inhibición de la actividad biológica de la actividad de la Hsp90 extracelular puede evaluarse determinando uno o más indicadores de la actividad biológica de la Hsp90 extracelular, tales como la capacidad invasora dependiente de Hsp90. Estos indicadores de la actividad biológica de Hsp90 pueden evaluarse mediante uno o más de diversos ensayos *in vitro* o *in vivo* (ver ejemplos). Preferentemente, la capacidad de una molécula para inhibir la actividad de Hsp90 se evalúa inhibiendo la capacidad invasora inducida por Hsp90 de células humanas invasoras, particularmente las células utilizadas en los ejemplos.

15 Una "molécula inhibidora de la función de la Hsp90 extracelular" no es una molécula inhibidora general de la función de las proteínas, como las proteasas, los agentes desnaturizantes, por ejemplo, la urea o el clorhidrato de guanidinio, los átomos de metales pesados o las moléculas pequeñas (por ejemplo, aldehídos o isocianatos) que reaccionan de forma covalente y no específica con moléculas biológicas (lípidos, proteínas, azúcares). Se entiende la inhibición como una disminución de la función, cuando se compara con un control negativo con las mismas condiciones experimentales, pero sin la molécula de la invención. De forma adicional, en el caso de un polipéptido, particularmente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, se considera que éste inhibe la función biológica de la Hsp90 extracelular si reduce la capacidad invasora de las células cancerosas, en un experimento tal como se describe en los ejemplos, más de un 30%, preferentemente más de un 60%, cuando dicho fragmento de anticuerpo se halla presente a una concentración entre 1 nM y 50 µM, preferentemente alrededor de 20 µM.

20 Adicionalmente, respecto a los inhibidores de la Hsp90 extracelular, dicho inhibidor queda incluido en la presente invención si reduce la capacidad invasora de células cancerosas invasoras en un experimento, tal como el descrito en los ejemplos más del 30%, preferentemente más del 60%, cuando se halla presente en una concentración entre 10 nM y 100 µM, preferentemente alrededor de 1 µM.

25 Tal como se utiliza en la presente invención, "Hsp90 extracelular" es una Hsp90 que está asociada de forma libre con la membrana celular y fuera de la célula y no debe entenderse que incluya la Hsp90 aislada. Este término puede incluir la inserción de la Hsp90 en la membrana mediante modificaciones post-traduccionales o integración física, de manera que quede expuesta al aspecto extracelular de la célula o la secreción de la Hsp90 al espacio extracelular.

30 El término "inhibidor" de la Hsp90 extracelular incluye cualquier entidad que se una a la Hsp90 extracelular y disminuye su función, especialmente respecto a propiedades celulares tales como la capacidad invasora y/o el potencial metastásico. Dicha entidad puede ser una molécula pequeña (es decir, preferentemente que posea un peso inferior a 1.500 Da), iónica o no iónica, orgánica o no orgánica, macromoléculas naturales o no naturales, un polipéptido que puede estar modificado, en particular con grupos azúcar naturales o no naturales, o modificado de cualquier otro modo, un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal, fragmentos de anticuerpo, etc.

35 El término "un" no debe interpretarse en el sentido de "uno" si no que también significa "uno y/o más de uno". Si no se especifica lo contrario.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para que la invención descrita en el presente documento se entienda de forma más completa, se proporciona la siguiente descripción detallada.

55 La presente invención se refiere a inhibidores que puede unirse específicamente a la Hsp90 extracelular y de forma más particular pueden inhibir la función de la Hsp90 relacionada con la capacidad invasora y/o potencial metastásico de las células cancerosas. El inhibidor de la Hsp90 extracelular es preferentemente o bien esencialmente incapaz de entrar en el interior de la célula o está modificado de manera que la modificación impide esencialmente su captación celular. La modificación de los inhibidores de la presente invención puede conseguirse conjugando los inhibidores con macromoléculas naturales tales como polipéptidos o azúcares o con polímeros artificiales compatibles biológicamente.

60 Preferentemente, el inhibidor es un bioconjugado con, respectivamente, otra proteína, una matriz sólida (por ejemplo, como una perla), con sí mismo formando polímeros, una agente citotóxico que incrementa adicionalmente la toxicidad frente a las células diana, o una molécula efectora, que es capaz de modificar la célula que expresa Hsp90 o atraer células inmunitarias.

- 5 Los inhibidores para la inhibición de la Hsp90 pueden ser, por lo tanto, inhibidores ya conocidos (de la Hsp90 intracelular), tales como la geldanamicina y sus análogos tales como el 17 AAG, el radicicol, los antibióticos tipo coumarina tales como la novobiocina o inhibidores de la Hsp90 basados en purinas tales como el PU3, cuando se utilizan para inhibir la Hsp90 extracelular. Sin embargo, es preferente que los inhibidores conocidos sean modificados de manera que se elimina cualquier efecto secundario asociado con la posible toxicidad de los inhibidores de la Hsp90 (intracelular.)
- 10 La lista de agentes citotóxicos incluye, sin carácter limitante, daunorrubicina, taxol, adriamicina, metotrexato, 5 FU, vinblastina, actinomicina D, etopósido, cisplatino, doxorubicina, genisteína, inhibidores ribosómicos (por ejemplo tricosantina) o varias toxinas bacterianas (por ejemplo, la exotoxina del género *Pseudomonas*, la proteína A del *Staphylococcus aureus*).
- 15 El inhibidor se selecciona preferentemente del grupo formado por polipéptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, coumarina y/o inhibidores de Hsp90 basados en purinas y sus análogos.
- 20 Los bioconjugados que comprenden los polipéptidos, particularmente un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de la invención, conjuntamente con grupos citotóxicos se forman utilizando una diversidad de agentes acopladores de proteínas bifuncionales. Algunos ejemplos de dichos reactivos son N-succinimidil 3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP), derivados bifuncionales de imidoésteres tales como el dimetil adipimidato HCl, ésteres activos tales como el bis (R-azidobenzoil) hexanodiamina, derivados bis-diazonio tales como el bis- (R-diazoniobenzoil)etilendiamina, disiocianatos tales como el tolilén 2,6-diisocianato, y compuestos fluorados bis activados tales como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno. Los métodos útiles para la producción de bioconjugados se describen en detalle en March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure ("Química orgánica avanzada: Reacciones, mecanismos y estructura de March"), 5ª Edición, Wiley-Interscience; o Bioconjugate Techniques ("Técnicas de bioconjugados"), Ed. Greg Hermanson, Academic Press.
- 25 El polipéptido de la invención es un anticuerpo, en una realización preferente un anticuerpo derivado de un fragmento de anticuerpo scFv, en otra realización preferente un anticuerpo policlonal o monoclonal, particularmente un anticuerpo monoclonal humano.
- 30 Los anticuerpos anti-Hsp90 humana que se unen a la Hsp90 extracelular pueden seleccionarse a partir de inmunoglobulinas modificadas, por ejemplo, anticuerpos producidos mediante técnicas químicas o recombinantes o anticuerpos humanizados, anticuerpos mutados en un sitio específico, que muestran una identidad substancial en la secuencia de aminoácidos de sus regiones CDR, particularmente en su región CDR3, con los fragmentos de anticuerpo correspondientes de la presente invención y retienen substancialmente la misma afinidad por la Hsp90 que los fragmentos de anticuerpo correspondientes.
- 35 En otra realización preferente el anticuerpo anti-Hsp90 humana se selecciona del grupo formado por IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, en particular IgG e IgM, más particularmente IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4.
- 40 En otra realización preferente de la presente invención, el inhibidor de la invención es particularmente un fragmento de anticuerpo.
- 45 Preferentemente, el inhibidor de la presente invención es un fragmento de anticuerpo, en particular un scFv, dsFv, Fab', Fab, F(ab')₂, Fv, un anticuerpo de dominio único o un diacuerpo, más particularmente un scFv, dsFv, Fv, un anticuerpo de dominio único o un diacuerpo, aún más particularmente un scFv un anticuerpo de dominio único o un diacuerpo e incluso más preferentemente un scFv.
- 50 En otra realización, el fragmento de anticuerpo de la presente invención, reconoce específicamente uno o más epítopos de la Hsp90, o epítopos de variantes conservadas de la Hsp90 o fragmentos peptídicos de la Hsp90.
- 55 A modo de ejemplo, un modo de incrementar la actividad biológica de las moléculas de la presente invención es utilizar las moléculas (o ligandos) en combinación con CALI (Inactivación por láser/luz mediante cromóforos)
- 60 El principio del CALI (Inactivación por láser/luz mediante cromóforos) se basa en la iniciación local de una reacción fotoquímica que provoca la generación de especies reactivas de vida corta, que a su vez modifican selectivamente la molécula diana y provocan su inactivación funcional. Se marcan ligandos altamente específicos pero no inhibidores (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, pequeñas moléculas) con un fluoróforo adecuado (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína). Tras la formación del complejo entre la molécula diana (por ejemplo proteínas) y el ligando, el complejo se irradia con luz láser o luz blanca para excitar respectivamente el cromóforo o el fluoróforo. La excitación desencadena una reacción fotoquímica que inicia la generación de especies reactivas de vida corta (por ejemplo radicales hidroxilo o especies de oxígeno altamente reactivas). Estas especies reactivas modifican la proteína en un pequeño radio alrededor de su lugar de generación. La distancia que viaja una especie reactiva es muy corta
- 65

debido a su vida corta. Por lo tanto, las modificaciones de los residuos de aminoácidos dentro de la proteína se producen muy cerca del lugar de unión del ligando. El efecto perjudicial queda restringido a un radio de 15-40 Å, que está muy por debajo de la distancia media entre dos proteínas dentro de una célula, que es de aproximadamente 80 Å (asumiendo una concentración media de proteínas citoplasmáticas de 300 mg/mL y un tamaño medio de las proteínas de 50 kDa), garantizando una elevada resolución espacial del proceso. Este principio se muestra en la figura 12. En aquellos casos en los que el lugar de unión del ligando está cerca o dentro de un dominio funcional importante de la proteína, estas modificaciones inducidas provocan la inactivación permanente de la proteína. La inactivación funcional de la proteína se determina en un ensayo con una lectura adecuada y se evalúa en el contexto de las funciones fisiológicas relevantes para la patología, como la invasión celular, la adherencia celular, la señalización celular o la apoptosis.

Se ha demostrado que la inactivación de proteínas mediante CALI es muy específica para la proteína correspondiente. Linden y otros han demostrado que puede inactivarse eficientemente la β -galactosidasa con un anticuerpo anti- β -galactosidasa marcado con verde de malaquita en presencia de fosfata alcalina en la misma solución. Se produjo una inactivación superior al 95% de la β -galactosidasa tras 10 minutos de irradiación con láser mientras que la alcalina no se afectó en absoluto (Linden y otros. (1992) *Biophys. J.* 61, 956-962). Jay también ha demostrado que un anticuerpo marcado con colorante unido a un único epítipo de una proteína es suficiente para inactivar la acetilcolinesterasa (Jay (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5454-58).

Henning y otros han descrito que CALI se utilizó con éxito frente a una gran variedad de proteínas (Henning y otros. *Drug Discovery* 62-71). Entre estas proteínas se incluyen proteínas de membrana (por ejemplo cadenas α -, β -, y ϵ -del receptor de las células T, integrinas β 1, efrina A5, o el receptor FAS), moléculas de transducción de señal (por ejemplo calicineurina, ciclofilina A o PKC), proteínas del citoesqueleto (por ejemplo actina, ezrina o quinesina) o factores de transcripción. Henning y otros han descrito además que CALI puede utilizarse para identificar nuevas proteínas como dianas terapéuticas y al mismo tiempo elucidar su función en el contexto biológico de interés (Henning y otros. (2002) *Current Drug Discovery May*, 17-19) (Descubrimientos actuales de medicamentos).

Diversos ejemplos de aplicación de CALI muestran que esta técnica es capaz de convertir ligandos específicos pero no inhibidores en reactivos bloqueantes. Por lo tanto, estos ligandos pueden utilizarse para modular la acción de ligandos inhibidores. CALI también puede utilizarse para incrementar adicionalmente el efecto inhibitor de un ligando que ya posee un efecto inhibitor por sí mismo. La parte experimental muestra ejemplos en los que CALI se integra en un ensayo de invasión o adherencia.

La modificación química de la molécula puede ser la adición de cromóforos o fluoróforos. Un cromóforo es aquella parte de una molécula que posee una elevada actividad óptica debida a electrones móviles que interactúan con la luz. Los cromóforos se denominan fluoróforos, si absorben luz en el rango visible del espectro. Algunos ejemplos de cromóforos son, por ejemplo, los derivados de la fluoresceína, los derivados de la rodamina, los derivados de la cumarina, los derivados de la porfirina, los derivados de la ftalocianina, los derivados de las naftalocianinas, los derivados de la eosina, los derivados del trifenilmetano, o los derivados de la acridina. En *The Sigma Aldrich Handbooks of Stains and Dyes* (Manuales Sigma Aldrich de tinciones y colorantes), Ed., F.J. Green (1990) ISBN nº. 0-941633-22-5 se da a conocer un listado de cromóforos útiles para la modificación química de biomoléculas.

En otro aspecto de la presente invención, el inhibidor se marca con un marcador detectable. Particularmente, son ejemplos de marcadores detectables los radioisótopos, los cromóforos, los fluoróforos y los enzimas.

Utilizando un bioconjugado o un polipéptido de la invención, particularmente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención, puede detectarse la expresión de un antígeno Hsp90 asociado al cáncer. Se toma una muestra de un individuo, por ejemplo una muestra de biopsia tomada del tejido que se sospecha que tiene un tumor. Generalmente, la muestra se trata antes de realizar el ensayo. Entre los ensayos que pueden emplearse se incluyen el ELISA, el RIA, el EIA, el análisis de transferencia Western, las tinciones inmunohistoquímicas y similares. Según el ensayo utilizado, los antígenos o los anticuerpos pueden marcarse con un enzima, un fluoróforo o un radioisótopo. (Ver, por ejemplo, Coligan y otros. (1994) *Current Protocols in Immunology* ("Protocolos actuales en inmunología"), John Wiley & Sons Inc., Nueva York, Nueva York; y Frye y otros. (1987) *Oncogene* 4, 1153-1157.)

En otra realización, el polipéptido modificado o el bioconjugado, se une a la Hsp90 humana extracelular y reduce la capacidad invasora y/o el potencial metastásico de las células cancerosas. En los ejemplos se aporta un método para medir el nivel de capacidad invasora de las células cancerosas humanas.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende cantidades efectivas de un inhibidor de la Hsp90 extracelular, particularmente para disminuir la capacidad invasora y/o el potencial metastásico de las células cancerosas. Preferentemente, el inhibidor es o esencialmente incapaz de entrar en el interior de las células o está modificado de manera que se impide esencialmente la captación celular del mismo. La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer o las metástasis.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende cantidades efectivas de al menos un inhibidor, particularmente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y a la utilización del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del cáncer o las metástasis.

5 En otra realización, la presente invención incluye un kit diagnóstico. Dicho kit comprende al menos un bioconjugado y/o al menos un inhibidor o una versión marcada de los mismos, y consta adicionalmente de los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo un ensayo competitivo o sándwich estándar. Dicho kit diagnóstico puede utilizarse para la determinación del potencial invasivo de muestras biológicas, en concreto de ciertos tipos de células cancerosas. El kit comprenderá además típicamente un contenedor.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el cribado o análisis del comportamiento invasivo y/o metastásico de las células ex vivo, comprendiendo las etapas de:

- 15 a) poner en contacto la célula con uno o más inhibidores de la Hsp90 bajo condiciones que impiden esencialmente la captación celular de dicho inhibidor de la Hsp90;
- b) analizar la migración de las células tratadas de acuerdo con la etapa a);
- c) comparar la migración de las células tratadas de acuerdo con la etapa a) con células no tratadas y, opcionalmente,
- 20 d) determinar el porcentaje de migración de las células tratadas de acuerdo con la etapa a) respecto a las células no tratadas.

25 En una realización preferente de este aspecto de la presente invención, el cribado se realiza de manera que las células se ponen en contacto con una matriz gelatinosa bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de las mismas y la etapa b) comprende, por lo tanto, analizar la migración de las células a través de la matriz.

30 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "matriz gelatinosa" se entiende como una sustancia semi-sólida con un contenido en agua de al menos el 90%, que permite el cultivo de las células en contacto con la matriz y permite la migración de las células cancerosas invasoras a través de un bloque de dicha "matriz gelatinosa" de entre 0,1 mm y 1 mm, preferentemente de un grosor de 0,3 mm, pero que no permite la migración de las células no invasoras. Son ejemplos de dicha "matriz gelatinosa" las sustancias que se asemejan a la matriz extracelular en cuanto a composición en proteínas y carbohidratos, particularmente el producto disponible comercialmente "Matrigel". Particularmente, la "matriz gelatinosa" comprende una proteína seleccionada del grupo formado por colágeno tipo IV, fibronectina y laminina. Más particularmente, la matriz gelatinosa comprende las proteínas colágeno tipo IV, fibronectina y laminina. Más preferentemente, la matriz gelatinosa comprende las proteína colágeno tipo IV, laminina, entactina, nidogén, y proteoglicanos heparán sulfato o colágeno tipo IV, fibronectina, laminina, nidogén, entactina y vitronectina.

40 El documento da a conocer además un método para identificar un inhibidor que se une de forma específica a Hsp90, mediante el cribado de una biblioteca de ALDUs, en el que estos inhibidores son capaces de inhibir la capacidad invasora, la adhesividad y/o el potencial metastásico relacionados con Hsp90 de las células cancerosas. Dicho método comprende las etapas de:

- 45 a) poner en contacto una biblioteca de unidades amplificables de expresión de ligandos (ALDUs) con una célula cancerosa, por ejemplo célula de sarcoma;
- b) separar dichas célula cancerosa y los ALDUs unidos a la misma de los ALDUs no unidos a dicha célula;
- c) amplificar los ALDUs unidos a dicha célula;
- d) identificar los ALDUs o los ligandos derivados de los mismos tras la etapa c), que modifican dicha actividad biológica de Hsp90 mediante un ensayo funcional de cribado;
- 50 e) identificar los ALDUs o los ligandos derivados de los mismos tras la etapa d) capaces de unirse a Hsp90;
- f) determinar la identidad química del ligando.

El orden preferente, pero no el único posible, de las etapas es a, b, c, d, e y opcionalmente f.

55 Tal como se utiliza en la presente invención el término "unidades amplificables de expresión de ligandos" (ALDUs) son moléculas o grupos de moléculas con una función doble: pueden unirse a una célula diana mediante un ligando; y pueden transportar asociada físicamente con el ligando información sobre su identidad, lo que permite identificar y amplificar unidades individuales. Son ejemplos de ALDUs, oligonucleótidos, particularmente ARNs, útiles para el proceso de selección-amplificación (SELEX), fagos o bibliotecas de expresión en fagos, virus o bibliotecas de expresión en virus, ribosomas o técnicas de expresión en ribosomas, pero también perlas individualizadas que portan un ligando o molécula identificable, particularmente entidades químicas, por ejemplo moléculas pequeñas unidas a perlas, que son reconocibles por etiquetas químicas inertes. Son preferentes aquellas ALDUs que comprenden un ácido nucleico como componente identificable. Dichas ALDUs o bien pueden amplificarse in vitro, por ejemplo mediante métodos de amplificación de ácidos nucleicos como la RT-PCR, PCR, LCR y similares, o bien pueden amplificarse in vivo, por ejemplo un fago particular puede infectar una bacteria y dar lugar a, tras varios

ciclos de infección, a millones de unidades de una progenie virtualmente idéntica. Una biblioteca es una colección de ALDUs similares, pero en general no idénticos, por ejemplo fagos de una biblioteca de fagos que expresan diferentes scFvs en el contexto de una superficie de los fagos por otro lado idéntica.

5 Un ligando “derivado de una ALDU”, tal como se utiliza en la presente invención, es un ligando que ha sido expresado por dicha ALDU, que se ha seleccionado mediante la unión a la superficie de una célula diana. A modo de ejemplo, si la ALDU es un fago de una biblioteca de fagos que expresan scFvs el “ligando derivado de una ALDU” es en este caso un polipéptido, en concreto un scFv. Como otro ejemplo, en el caso de expresión ribosómica, el
10 ligando “derivado de una ALDU” es el polipéptido, que se presentó por el complejo formado por el ribosoma, el ARN y el polipéptido.

El método combina ventajosamente una etapa de cribado basada en la unión a la superficie de una célula cancerosa con una etapa de cribado basada en un ensayo funcional. Por lo tanto, se pone en contacto una biblioteca de ALDUs con una célula cancerosa de manera que aquellas ALDUs de la biblioteca con especificidad por un antígeno de
15 superficie de la célula cancerosa puedan unirse a estructuras asociadas con la superficie de, por ejemplo, la célula cancerosa. Por ejemplo, puede permitirse que fagos de una biblioteca de fagos que expresan anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se unan a células cancerosas en cultivo o, como otro ejemplo, puede permitirse que ARNs de una biblioteca de oligonucleótidos ARN se unan a dichas células cancerosas.

20 La identidad de las ALDUs que representan el anticuerpo o fragmento de anticuerpo obtenido en la etapa d) puede determinarse, por ejemplo, mediante secuenciación del ADN que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o, en el caso de una biblioteca comercial con fagos numerados o dispuestos en una cuadrícula, determinando el número del fago o su posición en la cuadrícula. El número o la posición en la cuadrícula pueden revelar la identidad del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo representado por la ALDU.

25 Tal como se utiliza en la presente invención, un “ligando” es una molécula expresable por una unidad amplificable de expresión de ligandos (ALDU). Un ligando puede ser cualquier entidad que se una a la Hsp90 extracelular e inhiba su función. Un ligando es la parte de una ALDU a través de la cual la ALDU puede unirse a una diana.

30 Tal como se utiliza en la presente invención, un ligando “que se une específicamente a la Hsp90 extracelular” puede ser un ligando que se une a la Hsp90 bajo las condiciones de tampón descritas en los ejemplos. La constante de disociación entre el ligando y la Hsp90 puede determinarse, por ejemplo, utilizando el denominado BIACORE System (ver, por ejemplo, Fivash y otros Curr Opin Biotechnol. (1998) 9, 97-101) y “unirse específicamente” puede entenderse que significa que la constante de disociación entre el ligando y Hsp90 es inferior a 10 μ M,
35 preferentemente inferior a 1 μ M, más preferentemente inferior a 500, 400, 300, 200, 100, 50, 20 nM, y de forma más preferente entre 0,1 nM y 20 nM si se determina bajo condiciones estándar, por ejemplo a 20°C, presión ambiente y en un tampón adecuado, por ejemplo, Tris 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM a un pH global de 7,0.

40 Tal como se utiliza en la presente invención, “poner en contacto” dos componentes significa permitir que los dos componentes se asocien físicamente entre sí y se unan entre sí.

Tal como se utiliza en la presente invención, “separar” significa la separación física de dos o más componentes, por ejemplo una célula con una ALDU unida a la misma puede separarse de una ALDU libre mediante centrifugación, de forma que la célula con la ALDU unida a la misma precipita y la ALDU libre permanece en el sobrenadante.
45

Tal como se utiliza en la presente invención “amplificar” es cualquier proceso que incrementa el número de ALDUs o ligandos derivados de ALDUs por un factor de al menos dos, preferentemente por un factor de 10, 100, 1.000, 10.000, 100.000, 1.000.000, 10.000.000 o incluso mil millones. Por ejemplo un único fago puede ser amplificado infectando una bacteria, produciendo a continuación la bacteria infectada varias copias en su mayor parte idénticas del fago infectante, o una molécula de ADN puede ser amplificada mediante un proceso de PCR dando lugar a 10⁴ o más moléculas de ADN hijas en su mayor parte idénticas.
50

Tal como se utiliza en la presente invención, “identificar” significa localizar o reconocer un componente individual, por ejemplo una ALDU, con propiedades especiales y aislar dicho componente individual.
55

Tal como se utiliza en la presente invención, “determinar la identidad química de un ligando” significa determinar la composición estructural de un ligando. Por ejemplo, en el caso de que la biblioteca de ALDUs sea una biblioteca de fagos que expresan scFvs, “determinar la identidad química de un ligando” significará determinar la secuencia del polipéptido scFv, por ejemplo mediante secuenciación de la región que codifica el scFv del fago del cual deriva.
60

Tal como se utiliza en la presente invención “un ensayo de cribado” tiene como objetivo detectar una entidad, por ejemplo una ALDU, con propiedades especiales entre otras entidades similares con propiedades ligeramente diferentes. Para poder ser catalogado de ensayo de cribado deben analizarse al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o incluso 100 entidades en un determinado ensayo funcional para hallar entre ellas una o varias entidades con la función deseada.
65

En la etapa de separación (b.), según la presente invención, la célula cancerosa y las ALDUs unidas a la misma se separan de las ALDUs no unidas, para seleccionar aquellas ALDUs con especificidad para la célula cancerosa. La separación puede conseguirse, por ejemplo, eliminando la solución en la cual se ha realizado la etapa de contacto de las células cancerosas cultivadas que han crecido de forma adherida en una botella de cultivo y conjuntamente con la solución los ALDUs no unidas; o, como otro ejemplo, las células cancerosas con ARNs de una biblioteca SELEX unidos a las mismas pueden precipitarse mediante centrifugación, mientras que los ARNs no unidos quedan en el sobrenadante como parte de la solución, en la cual se había realizado la etapa de contacto. Alternativamente, la separación puede conseguirse mediante centrifugación, centrifugación por densidad, filtración, clasificación FACS, inmunoprecipitación o inmovilización sobre un soporte sólido. Por ejemplo una ALDU unida a una célula cancerosa puede separarse de las ALDUs no unidas utilizando el hecho de que el complejo de una ALDU unida a una diana posee propiedades bioquímicas diferentes en comparación con una ALDU no unida. Dichas propiedades bioquímicas que cambian pueden ser el tamaño, la unión específica, la densidad de carga, la densidad o similares.

La filtración puede separar las ALDUs unidas de las ALDUs no unidas, por ejemplo si el tamaño del filtro es tal que las ALDUs unidas a la célula cancerosa quedan retenidas por los poros del filtro, mientras que las ALDUs no unidas pueden pasar a través de los poros del filtro. Por lo tanto la filtración por tamaño es útil si la diana es grande, como una célula cancerosa, y la ALDU es pequeña, por ejemplo un fago, un virus, un ácido nucleico o un ribosoma que expresa un ligando.

La centrifugación por densidad separa las biomoléculas, según su densidad, La centrifugación por densidad puede aplicarse si la densidad de una ALDU unida a una diana es diferente de la de una ALDU no unida. Por ejemplo, la centrifugación por densidad puede aplicarse si una ALDU es densa, por ejemplo un ribosoma que expresa un ligando, y la diana no es tan densa, como las células de sarcoma o vehículos derivados de la membrana de una célula cancerosa.

FACS puede separar el complejo de una ALDU unida a una célula cancerosa de las ALDUs no unidas sobre la base de la fluorescencia de la diana. FACS puede realizarse marcando la célula cancerosa con un colorante fluorescente y a continuación pasando la célula cancerosa marcada en un medio de suspensión a través de una boquilla cuentagotas estrecha de manera que cada célula cancerosa se encuentra en una gotita por separado. Habitualmente se utiliza un sistema de detección basado en láser para excitar el colorante fluorescente, confiriendo a las gotitas con, por ejemplo, células cancerosas fluorescentes, una carga eléctrica. A continuación pueden separarse las gotitas cargadas y no cargadas a medida que pasan por las placas de carga y pueden recolectarse en dos tubos diferentes. De este modo, las pequeñas gotitas que contienen ALDUs unidas a una célula cancerosa se separan de la solución madre que contiene las ALDUs no unidas.

Puede realizarse la inmovilización de la célula cancerosa sobre un soporte sólido para separar las ALDUs unidas a la célula cancerosa inmovilizada de las ALDUs no unidas. La inmovilización de la célula cancerosa sobre un soporte sólido se realiza habitualmente utilizando un soporte sólido con una superficie activa o la unión específica de la superficie del soporte sólido con la célula cancerosa utilizando, por ejemplo, biomoléculas con la propiedad de unirse específicamente con la célula cancerosa. Para separar las ALDUs unidas a la célula cancerosa inmovilizada de las ALDUs no unidas, se separa la célula cancerosa inmovilizada de la solución madre que contiene las ALDUs no unidas.

La separación de las ALDUs unidas a las células cancerosas inmovilizadas de la solución madre que contiene las ALDUs no unidas puede realizarse eliminando la solución madre que contiene las ALDUs no unidas de las células cancerosas inmovilizadas. Por ejemplo, si la célula cancerosa está inmovilizada sobre, por ejemplo, el pocillo de una placa de microtitulación de plástico mediante interacciones covalentes, la solución madre que contiene las ALDUs no unidas puede separarse eliminando la solución y lavando los pocillos con solución de lavado.

En la etapa de amplificación (c.), según el método de la presente invención, las ALDUs unidas a la diana se amplifican, para obtener concentraciones lo suficientemente elevadas de ALDUs para que sean útiles para ser aplicados en un cribado funcional. Esta etapa de amplificación utiliza la propiedad intrínseca de las ALDUs de ser amplificable. Por ejemplo, fagos que expresan, por ejemplo un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que han sido separados de los fagos no unidos en la etapa b), pero que siguen unidos a la célula cancerosa, pueden ser amplificados recuperando en primer lugar los fagos unidos, por ejemplo, mediante la elución de los fagos de las células cancerosas y utilizando a continuación el eluato de fagos recuperados para infectar bacterias, por ejemplo *Escherichia coli*. A continuación, la amplificación de los fagos en *Escherichia coli* provoca un incremento significativo del número total de fagos, pero de manera que la concentración de aquellos fagos particulares que eran capaces de unirse a las células cancerosas se incrementa dramáticamente. De acuerdo con una realización preferente, la etapa de amplificación se realiza o bien eluyendo la ALDU unida a una célula cancerosa, o bien lisando una célula cancerosa bajo condiciones en las que la ALDU siga siendo amplificable, y a continuación se amplifica. Las ALDUs unidas a células cancerosas pueden eluirse en primer lugar de las mismas, por ejemplo, utilizando soluciones de pH bajo y/o alto contenido en sal, como se demuestra en los ejemplos, y a continuación amplificarse, por ejemplo de manera que los fagos eluidos son utilizados para infectar *Escherichia coli* para producir un gran número de fagos

descendientes. Sin embargo, la etapa de elución de la diana, aunque sea conveniente, no es necesaria, como, por ejemplo, en el caso de bibliotecas de fagos en que los fagos unidos a las células cancerosas son capaces de infectar *Escherichia coli* y por lo tanto son capaces de producir un gran número de descendientes idénticos, y por lo tanto son amplificables incluso cuando siguen unidos a la célula cancerosa. En consecuencia, los fagos no deben necesariamente extraerse de la célula diana, dado que un fago que sigue unido a una célula diana puede infectar bacterias añadidas y por lo tanto ser amplificado.

Como otro ejemplo, el ARNm de una biblioteca de expresión en ribosomas, que está asociado con la superficie de una célula cancerosa gracias a su unión al ribosoma que expresa el polipéptido correspondiente al ARNm puede utilizarse directamente para realizar una RT-PCR, sin la necesidad de eliminar la ALDU intacta de la diana antes de la amplificación de la misma. Así, la etapa en la cual la ALDU unida a una diana se recupera de la diana antes de amplificar la ALDU, es una etapa opcional.

La amplificación de la ALDU también puede consistir en determinar la identidad química del ligando de dichas ALDUs, que están unidas a la célula cancerosa y a continuación amplificar los ligandos. Es decir, por ejemplo, que en el caso de una biblioteca de fagos, que expresa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, puede clonarse el ADN que codifica dichos ligandos a partir de los fagos, que están unidos a la célula cancerosa, por ejemplo, mediante PCR, y a continuación puede producirse recombinantemente el ligando, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para obtener unas cantidades suficientes de ligando para que puedan utilizarse en un ensayo funcional de cribado. De este modo, no se amplifica propiamente la ALDU, si no el ligando expresado por la ALDU. Ello queda, sin embargo, dentro del alcance de la presente invención, dado que el objetivo de la etapa de amplificación es la generación de una concentración de ligando lo suficientemente elevada para que sea útil en un ensayo funcional de cribado y ello puede conseguirse ya sea amplificando el ligando o la ALDU que lo expresa.

En la etapa de identificación (d.), según el método de la presente invención, una ALDU o un ligando derivado de una ALDU, que se ha unido a una célula cancerosa se identifica basándose en sus efectos sobre una función biológica de la Hsp90 que se analiza en un ensayo funcional de cribado. Para dicho ensayo funcional de cribado, las ALDUs o los ligandos derivados de las mismas se individualizan ventajosamente, de manera que una señal o un patrón del ensayo funcional de cribado es relacionable con una ALDU individual o un tipo individual de ligando. Ello puede realizarse, por ejemplo, rellenando pocillos independientes de una placa con múltiples pocillos con ligandos individuales y realizando a continuación en dichos pocillos individuales un ensayo adecuado para una función biológica deseada de la Hsp90.

En otro ejemplo pueden individualizarse los fagos, que se han unido a una célula cancerosa, y han sido separados de los fagos no unidos, infectando bacterias y sembrando las bacterias infectadas en por ejemplo, agar blando, de manera que se forman placas individuales, que representan clones de fagos individuales. A continuación, pueden analizarse los efectos de dichas placas individuales en un ensayo biológico de cribado para una función de la Hsp90. En dicho tipo de ensayo, son identificables las placas individuales con efectos en el ensayo funcional de cribado para una función de la Hsp90. A continuación, puede identificarse el ligando expresado por los fagos de la placa, por ejemplo, mediante secuenciación del ARN del fago de una placa aislada, que representa una clona de un solo fago, inicialmente seleccionado por su capacidad de unirse a una célula cancerosa. Así, en aquellos casos en los que se utiliza la propia ALDU en el ensayo funcional de cribado, puede determinarse, si se desea, la identidad del ligando expresado por la ALDU.

En una realización preferente, el ligando es capaz de inhibir una función biológica de la Hsp90. Por ejemplo, la función biológica de la Hsp90 puede ser la invasión, o la adherencia.

En otra realización la ALDU o el ligando derivado de una ALDU y utilizado en el ensayo funcional de cribado como en la etapa d) del método, según la presente invención, identifica un ligando no modificado según la presente invención.

En otra realización adicional de la presente invención, las ALDUs o los ligandos derivados de una ALDU utilizados para el ensayo funcional de cribado, según la etapa d) del método de identificación de un ligando, según la presente invención, se modifican químicamente para incrementar su actividad biológica o para dotar la ALDU o el ligando de actividad biológica. A modo de ejemplo, un modo de incrementar la actividad biológica de una ALDU o de un ligando o de dotar la ALDU o el ligando de actividad biológica es utilizar la ALDU o el ligando en combinación con la Inactivación por Láser Mediante Cromóforos (CALI), tal como se ha descrito anteriormente. La CALI también puede utilizarse para incrementar aún más el efecto inhibitorio de un ligando que ya posee un efecto neutralizador e inhibitorio por sí mismo.

Ello hace evidente que la naturaleza del ligando expresado en la ALDU no es crítico para identificar moléculas adecuadas, es más la capacidad de la ALDU de ser identificable y amplificable, la que tiene influencia sobre el éxito del cribado de moléculas inhibitorias de la Hsp90, según la invención.

5 Sin embargo, tal como se ha explicado previamente, la amplificación de la ALDU puede conseguirse incrementando el número de ALDUs individuales, pero también incrementando el número de ligandos expresados por cada ALDU individual. Dado que en principio ello puede conseguirse también por una perla individual que muestra una entidad química pequeña en bibliotecas químicas combinatorias (ver Ohlmeyer y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90, 10922-26; Liu y otros J. Am. Chem. Soc. (2002) 124, 7678-80; Liang y otros, Science (1996) 274, 1520-2) dichas bibliotecas con formato de perlas también son bibliotecas de ALDUs. Las moléculas pequeñas pueden sintetizarse en perlas microesféricas, que pueden clasificarse con etiquetas químicas inertes. Durante cada etapa del esquema sintético, una molécula etiqueta que codifica el número de etapa y el reactivo químico utilizado en dicha etapa se une a la perla. Este conjunto de etiquetas puede entonces ser utilizado como un código binario para registrar el historial de la reacción de cada perla. El compuesto identificado puede entonces ser sintetizado fácilmente a mayor escala.

15 Una ALDU, tal como se utiliza en la presente invención, es una ALDU biológica de forma que la información sobre su identidad se encuentra almacenada en forma de un ácido nucleico, por ejemplo ARN o ADN. En una realización preferente, la ALDU se selecciona del grupo formado por virus útiles para la expresión viral, fagos útiles para la expresión en fagos, bacterias útiles para la expresión en bacterias, ribosomas útiles para la expresión en ribosomas, levaduras útiles para la expresión en levaduras y oligonucleótidos útiles para la selección y amplificación.

20 Pueden ser fagos útiles para la expresión en fagos todos aquellos fagos que pueden obtenerse en cultivo, que son susceptibles de técnicas de ingeniería genética y que son capaces de expresar un ligando extraño sobre su superficie. En Smith y otros (1985) Science, 228, 1315-17 se dio a conocer la expresión en fagos, en WO 91/17271 se dio a conocer la expresión en fagos de un anticuerpo.

25 Son bacterias útiles para la expresión en bacterias todas aquellas bacterias que pueden ser mantenidas en cultivo, que son susceptibles a técnicas de ingeniería genética y que son capaces de expresar un ligando extraño sobre su superficie. En Dougherty y otros, (1999) Protein Eng. 12,613-21; y Westerlund-Wickstrom B. (2000) Int. J. Meth. Microbiol. 290, 223-30 se exponen ejemplos de bacterias útiles para la expresión en bacterias.

30 En Shaffizel y otros, (1999) J. Immunol. Methods 231, 119-35; y Willson y otros, (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750-5 se dan a conocer ribosomas útiles para la expresión en ribosomas.

En Tuerk y Gold (1990) Science 249, 505-10, y Tuerk y otros, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6988-92 se dan a conocer oligonucleótidos útiles para la selección/amplificación (Selex).

35 Sin embargo, también son ALDUs útiles aquellos eucariotas inferiores que pueden ser cultivados y son susceptibles de técnicas de ingeniería genética y, por lo tanto, son capaces de expresar un ligando extraño en su superficie, por ejemplo levaduras modificadas genéticamente, tal como se da a conocer en Boder y Wittrup (2000) Methods Enzymol. 328, 430-44.

40 El método de identificación de un ligando de la invención comprende como etapa de identificación d) una separación espacial de las diferentes ALDUs del conjunto de ALDUs y a continuación el cribado de las ALDUs separadas espacialmente, según su efecto, sobre una función biológica de la Hsp90 de manera que el resultado obtenido puede ser asignado a una ALDU individual. La separación espacial de las diferentes ALDUs de un conjunto de ALDUs puede realizarse, por ejemplo, rellenando diferentes pocillos de una placa de múltiples pocillos con un ligando individual y a continuación utilizar dichas placas de múltiples pocillos en un ensayo de cribado funcional. Si por ejemplo, en un pocillo se inhibe la función biológica de la Hsp90, entonces se identifica un ligando que inhibe la función de dicha función biológica de la Hsp90, dado que el investigador conoce la identidad de cada ligando que ha puesto en cada pocillo individual.

50 Además, el método de identificación de un ligando, según la presente invención, puede comprender la etapa de determinar la identidad del ligando, en la que dicha etapa de determinación se consigue mediante la secuenciación del ADN de una ALDU identificada, tomando una huella PCR del ácido nucleico de una ALDU identificada o, también, en el caso de un ligando derivado de una ALDU, mediante la espectrometría de masas de dicho ligando. La técnica de la huella de PCR (PCR fingerprinting) de, por ejemplo, fagos se da a conocer en Marks y otros (J. Mol. Biol. (1991) 222, 581-97). El análisis de espectrometría de masas de un ligando, por ejemplo un polipéptido, se da a conocer en Shevchenko y otros ((1996) Anal. Chem. 68, 850-58) o Spengler y otros ((1992) Rapid. Commun. Mass. Spectrum. 6, 105-8.).

60 El método de identificación de un ligando, según la presente invención, puede comprender además al menos una etapa de cribado adicional de ALDUs, por ejemplo en la que el cribado se basa en las propiedades bioquímicas de las ALDUs. Dicha etapa de cribado adicional puede comprender un método seleccionado del grupo formado por citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación, ensayos de unión, experimentos inmunohistoquímicos, estudios de afinidad, inmunotransferencias y matrices de proteínas. Las propiedades bioquímicas pueden determinarse por el tamaño, la forma, la densidad, la densidad de carga, la propiedad hidrofóbica, o la especificidad de unión de una ALDU o del ligando derivado de una ALDU. Las propiedades bioquímicas de la ALDU o del ligando derivado de un

65

ALDU forman la base de la aplicabilidad de los métodos previamente mencionados para el cribado de las ALDUs. La citometría de flujo se realiza habitualmente marcando las células con un colorante fluorescente y pasando a continuación dichas células marcadas en un medio de suspensión a través de una boquilla cuentagotas estrecha de manera que cada célula queda en una pequeña gotita independiente. Habitualmente se utiliza un sistema de detección basado en luz láser para excitar el colorante fluorescente registrándose las gotitas con, por ejemplo, células positivas a fluorescencia.

El método de identificación de un ligando de la presente invención puede comprender además una etapa de selección sustractiva. La etapa de selección sustractiva es una etapa que elimina las ALDUs con una propiedad no deseada. Por ejemplo una etapa de selección sustractiva puede realizarse eliminando las ALDUs capaces de unirse a una célula control, si la propiedad de unión a la célula control es una propiedad no deseada. A modo de ejemplo, si se quiere seleccionar ALDUs específicas para células cancerosas, se puede seleccionar primero aquellas ALDUs que se unen a las células cancerosas, eluir las ALDUs unidas, por ejemplo fagos y, a continuación eliminar aquellas ALDUs que son capaces de unirse a células no cancerosas, por ejemplo poniendo en contacto el conjunto de ALDUs eluidas con células no cancerosas y eliminando aquellas ALDUs que se unen a las células no cancerosas. Las ALDUs que permanecen en el sobrenadante son entonces ALDUs específicas para células cancerosas y pueden ser utilizadas a continuación en ensayos funcionales de cribado, según el método de identificación de ligandos de la presente invención.

En la etapa e) la masa o conjunto de ALDUs, por ejemplo fagos es enriquecido con ALDUs unidos a Hsp90. Los ALDUs unidos a Hsp90 pueden ser identificados finalmente en la etapa f) mediante diversos métodos conocidos en la técnica.

Adicionalmente, el método anterior comprende en lugar de las etapas e) y f) las etapas adicionales de:

- e) poner en contacto ALDUs, por ejemplo fagos aislados, con Hsp90 recombinante;
- f) lavar dicha Hsp90 con un detergente tampón y/o una solución de alta concentración salina; y
- g) eluir las ALDUs, por ejemplo fagos unidos a la Hsp90; y
- h) determinar la identidad del ligando, por ejemplo un anticuerpo o fragmento representado por dicha ALDU eluida, por ejemplo un fago.

El "detergente" utilizado puede ser una solución de detergente, preferentemente tampón, y puede ser Tween a una concentración entre 0,001 y 0,5%, particularmente entre 0,01 y 0,1%. Tal como se utiliza en la presente invención "alta concentración salina" significa una solución de alta concentración salina, preferentemente tampón, y posee una potencia iónica entre 10mM y 1M, particularmente entre 20 y 500 mM, más particularmente entre 50 y 350 mM, incluso más preferentemente entre 80 y 250 mM. Son aniones típicamente útiles, por ejemplo, cloruro, citrato, fosfato, hidrógeno fosfato o borato. Son cationes típicamente útiles, por ejemplo, sodio, potasio, litio, calcio o magnesio.

La solución tampón del párrafo anterior posee típicamente un pH entre 7 y 8. Pueden utilizarse como tampones, por ejemplo, DMEM o PBS, particularmente entre un 1% y un 20%, más particularmente entre un 5% y un 15%, incluso más preferentemente aproximadamente un 10% de FCS.

El aislamiento de las células con fagos unidos a las mismas se realiza mediante una centrifugación suave a valores g entre 200 y 300 durante entre 3 y 20 minutos, particularmente entre 5 y 10 minutos. La elución de los fagos unidos, tanto a las células como a la Hsp90 inmovilizada, se realiza mediante un lavado con glicina a una concentración entre 2 y 100mM, particularmente entre 4 y 50mM, más particularmente entre 5 y 20mM, incluso más preferentemente alrededor de 10 mM a un pH entre 0 y 2,5, particularmente entre 1 y 2,5, más particularmente entre 1,5 y 2,5.

Además, pueden utilizarse todos los inhibidores extracelulares de la Hsp90, según la presente invención, para modular y especialmente para reducir la actividad y/o para reducir la secreción de metaloproteasa de la matriz (MMP).

Los ejemplos siguientes, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se presenta solamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la invasión de células HT-1080 teñidas a través de un filtro de 8 μm recubierto de Matrigel (fotografía de la izquierda). La fotografía de la derecha muestra la invasión de células HS-27 teñidas como control. La fluorescencia se midió tras seis horas de incubación a 37°C. Los datos se presentan como la media de n = 3 pocillos \pm DE.

La figura 2 muestra el efecto inhibitor de mAb 1.5.1 sobre la invasión por células HT-1080. La invasión se determinó en un ensayo de quimiotaxis con la cámara de migración celular recubierta con Matrigel tras irradiación con luz (CALI). La invasión por células HT-1080 en ausencia de moléculas inhibitoras se utilizó como control (barra izquierda). mAb 1.5.1 inhibió la invasión por células HT-1080 aproximadamente un 35% (valor $p < 0,001$).

La figura 3 muestra el efecto inhibitor de scFv1 sobre la invasión por células HT-1080. La invasión se determinó en un ensayo de quimiotaxis con la cámara de migración celular recubierta con Matrigel tras irradiación con luz (CALI). La invasión por células HT-1080 en ausencia de moléculas inhibitoras se utilizó como control (barras de la izquierda). scFv1 inhibió la invasión por células HT-1080 aproximadamente un 46% (valor $p < 0,05$).

La figura 4 muestra la correlación entre la inhibición de la invasión con la concentración de anticuerpo. Anticuerpos específicos contra Hsp90, Hsp90 α , Hsp90 β , (todos de Stress-gen), alfa-actinina-4 (Martin R. Pollak, Children's Hospital, Boston, MA) y mAb 1.5.1 se marcaron con FITC y se evaluaron en el ensayo de invasión tras irradiación con luz a 3 concentraciones (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). También se muestra un control positivo integrina $\beta 1$ (Chemicon 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y un control negativo (0, sin anticuerpo). Los anticuerpos mAb 1.5.1, anti-Hsp90, y anti-Hsp90 α demostraron una inhibición dependiente de la concentración de la invasión, mientras que Hsp90 β y alfa-actinina-4 no lo hicieron. Cada barra está normalizada frente a un control oscuro y representa la media \pm s.e.m (error estándar de la media) de al menos 2 experimentos por triplicado.

La figura 5 muestra los resultados de los experimentos de inmunoprecipitación. Se incubaron mAb 1.5.1 o un anticuerpo anti-Hsp90 (Stressgen #SPA-830) con lisados de células HT-1080. Se separaron los inmunocomplejos mediante SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con mAb 1.5.1 o el anticuerpo anti-Hsp90. Se reconoce la misma banda específica por ambos anticuerpos, indicando que ambos se unen a la misma proteína.

La figura 6 muestra la inmunohistoquímica conjunta de Hsp90 y mAb 1.5.1. El primer panel muestra la localización de Hsp90 α/β (Affinity Bioreagents #PA3012 & PA3-013) cerca del borde apical de las células HT-1080. El segundo panel muestra la misma localización cerca del borde apical utilizando mAb 1.5.1. Puede observarse la co-localización completa de las proteína cuando se sobreponen las imágenes (fotografía de la derecha). Ello demuestra que el mAb 1.5.1 y Hsp90 reconocen la misma proteína. Las imágenes se captaron (microscopio Zeiss Axiovert 10 utilizando una lente Neofluar 40-x con una abertura numérica de 0,75) utilizando conjuntos de filtros de excitación a 546 y 480 y conjuntos de filtros de emisión a 590 y 530 para rodamina (rojo, Hsp90 α/β) y FITC (verde, mAb 1.5.1) Las barras gráficas en las imágenes representan 10 μm .

Figura 6.1. La inmunocitoquímica de superficie sobre células HT-1080 utilizando anticuerpos contra integrina $\beta 1$ (c), y Hsp90 α (e) muestran un tinte superficial evidente. Los controles negativos [anti-ratón secundario solo (a), anti-conejo secundario solo (b)], α -actinina-4 y Hsp90 β (f) no muestran tinción superficial detectable. Las imágenes se visualizaron utilizando una Olympus BH-3, y se captaron utilizando una cámara digital SPOT (Digital Instruments).

Figura 6.2. La inmunocitoquímica de superficie sobre células de adenocarcinoma MDMDA231 utilizando anticuerpos contra la integrina- $\beta 1$ (c), y Hsp90a (e) muestran una tinción superficial evidente. Los controles negativos [anti-ratón secundario solo (a), anti-conejo secundario solo (b)], α -actinina-4 y Hsp90 β (f) no muestran tinción superficial detectable. Las imágenes se visualizaron utilizando una Olympus BH-3, y se captaron utilizando una cámara digital SPOT (Digital Instrument).

Figura 6.3. La inmunotransferencia de medio acondicionado por HT-1080 con anticuerpos específicos contra Hsp90 α y Hsp90 β muestra la ubicación extracelular de Hsp90 α , pero no de Hsp90 β . Hsp90 α se halla presente en el medio libre de suero acondicionado por células HT-10890, pero Hsp90 β está ausente.

La figura 7 muestra un experimento de biotilación de proteínas de superficie que se realizó en células HT-1080 vivas, tal como se ha descrito previamente. Tanto las proteínas de superficie biotiladas como las proteínas intracelulares no biotiladas se separaron mediante SDS-PAGE. Para el análisis de inmunotransferencia se utilizaron anticuerpos anti-Hsp90 y anti-alfa-actinina-4. Hsp90 muestra tanto una ubicación superficial (S) como intracelular (IC), mientras que la alfa-actinina se halla solamente en el conjunto de proteínas intracelulares.

La figura 8 muestra el resultado de un análisis FACS. Se muestra la actividad de unión de scFv1 a células HT-1080 (línea gruesa) y como control a células HS-27 (línea delgada).

La figura 9 muestra las coincidencias de péptidos del análisis de espectrometría de masas. Se corrieron fragmentos de péptido tripsinizados de la inmunoprecipitación de mAb 1.5.1 en un HPLC Surveyor y un espectrómetro de masas LCO Deca Ion Trap (ThermoFinnigan) con una columna C18 con un nanospray de 75 μm (New Objectives). Los PMF (fragmentos de masa peptídica) obtenidos se utilizaron para buscar todas las entradas para la especie *Homo sapiens* en las bases de datos NCBI y Swiss-Prot. Los péptidos coincidentes cubren un 24% (172 de 732 residuos) de Hsp90 α y un 33% (241 de 724 residuos) de Hsp90 β .

La figura 10 muestra el efecto dependiente de la concentración de la novobiocina sobre la invasión por células HT-1080. Las células HT-1080 se pre-trataron durante 1 hora con novobiocina o ácido nalidíxico y se realizó un ensayo de invasión. La novobiocina muestra una inhibición dependiente de la dosis de la invasión ($p \leq 0,01$ a $> 0,05$ mM por ANOVA). El ácido nalidíxico no posee ningún efecto sobre la invasión. La viabilidad de las células no se vio afectada en este ensayo (datos no mostrados). Cada punto de datos está normalizado frente al control sin fármaco y representa la media \pm s.e.m de 2 experimentos por triplicado.

La figura 11 muestra que la secreción de MMP disminuyó tras la adición de novobiocina. Se trataron 40.000 células HT-1080 durante 6 horas con novobiocina o ácido nalidíxico (como control) a las concentraciones indicadas. La actividad de MMP disminuyó más de un 75% a la concentración más alta analizada sin observarse reducción alguna de la actividad enzimática con el ácido nalidíxico. Las dos bandas (A y B) corresponden a MMPs no identificadas. (Imagen invertida para mayor claridad).

La figura 12 muestra el principio de la inactivación por láser/luz mediante cromóforos (CALI).

La figura 13 muestra el mapa de vector del vector de expresión de scFv pXP10 y la secuencia correspondiente.

La figura 14 muestra el mapa de vector del vector de expresión de scFv pXP14 y la secuencia correspondiente.

La figura 15 muestra las secuencias para la construcción de cebadores a partir de una biblioteca de ratón.

La figura 16 muestra las secuencias de aminoácidos (identificador de secuencia nº: 1) (la región CDR3 está subrayada) y la secuencia de nucleótidos (identificador de secuencia nº 2) de scFv1.

La figura 17 muestra que un anticuerpo anti-Hsp90 α co-inmunoprecipita MMP2 a partir de medio acondicionado por células HT-1080. Las proteínas inmunoprecipitadas se inmunotransfirieron con anti-MMP2 o anti-Hsp90 α . La inhibición de Hsp90 inhibe la secreción de MMP2.

La figura 18 muestra el contenido en MMP2 de medio acondicionado tras tratamiento con geldanamicina (GA). Se trataron células HT-1080 con geldanamicina (GA) 20 μ M en medio libre de suero y se analizaron mediante zimografía. La actividad de MMP2 (gelatinasa de 72 kDa) disminuyó aproximadamente un 35% tras el tratamiento con GA. El contenido total en proteína se visualizó mediante tinción argéntica para garantizar una carga igual.

La figura 19 muestra la correlación entre los contenidos en MMP2 y Hsp90 α . Se trataron células HT-1080 con perlas de agarosa conjugadas con geldanamicina (perlas GA) o perlas control (perlas) o se dejaron sin tratar (0). El medio acondicionado se inmunotransfirió para MMP2 o Hsp90 α . Los niveles de MMP2 activa disminuyeron un 80% y los niveles de pro-MMP2 disminuyeron un 15% tras el tratamiento con perlas GA.

La figura 20 muestra la disminución en la capacidad invasora de las células tumorales tras el tratamiento con diferentes cantidades de perlas de agarosa conjugadas con geldanamicina (perlas GA). Se trataron células HT-1080 o bien sin perlas o con un 5% o un 10% (volumen / volumen) de perlas GA o con perlas control y se analizó la capacidad invasora. Las células tratadas con perlas GA muestran una disminución del 45%, mientras que las células tratadas con perlas control solamente muestran una disminución del 15% en su capacidad invasora ($p < 0,01$, prueba T). Cada punto de datos está normalizado frente al control sin tratamiento y representa la media \pm error estándar de dos ensayos por triplicado.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales (por ejemplo mAb 1.5.1)

Se inmunizaron ratones con células HT-1080 fijadas o lisadas dos veces en un período de tres meses. Para la fijación, células HT-1080 confluentes (1×10^7 /botella de 75 cm²) se lavaron una vez con PBS, a continuación se extrajeron con PBS y rascado. Las células se volvieron a suspender mediante pipeteado, se centrifugaron durante 5 minutos a 220xg y se fijaron con 10 mL de paraformaldehído al 2% durante 10 minutos a 4°C. Se lavaron las células con PBS, y a continuación se volvieron a suspender en 1 mL de PBS. Las células lisadas se generaron mediante tripsinización de células HT-1080 confluentes, lavado una vez con PBS, y a continuación precipitado durante 1 minuto a 12.000xg. A continuación se lisaron las células en tampón de lisis (Triton X-100 0,67 en Tris-HCl 0,33m, pH 7,5) a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se centrifugó el lisado durante 5 minutos a 12.000xg. Se eliminó el Triton X-100 añadiendo el lisado a columnas PD-10 y eluyendo la proteína con 3,5 mL de PBS. La proteína se cuantificó utilizando el kit Micro-BCA (Pierce), y para la inmunización se utilizaron 150 μ g/mL/ratón.

La generación de hibridomas se realizó tal como se ha descrito previamente (Harlow y Lane, 1988).

En primer lugar se cribaron los sobrenadantes de los hibridomas fijando una monocapa confluyente de células HT-1080 (40.000 por pocillo de una placa de 96 pocillos de base fina y transparente) en paraformaldehído al 4% en PBS

5 durante 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,2% durante 5 minutos. Tras la incubación con sobrenadante de hibridoma no diluido, se realizaron tres lavados de 5 minutos con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% en solución salina tampón fosfato (PBS). Se añadió un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón marcado con FITC durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitieron los mismos lavados con 0,1% BSA/PBS y se añadió durante 1 hora a temperatura ambiente un anticuerpo de cabra anti-ratón, terciario, marcado con FITC. Tras una ronda final de lavados, las células se almacenaron en PBS a 4°C hasta el procesamiento de imágenes. Las imágenes se capturaron (microscopio Zeiss Axiovert 10 utilizando una lente Neofluar 40X con una abertura numérica de 0,75) utilizando un conjunto de filtros de excitación a 480 y un conjunto de filtros de emisión a 535 para FITC. Se puntuó la tinción de las células comparada con controles positivos (anti-integrina-β1, Chemicon #MAB1963 y anti-gelsolina, Sigma #G4896) y con controles negativos (sin anticuerpo primario).

15 Los hibridomas que dieron un resultado positivo en cuanto a la unión a HT-1080, se analizaron a continuación respecto a la expresión superficial mediante inmunocitoquímica de superficie. Para la inmunocitoquímica de superficie, se incubó una monocapa confluyente de células HT-1030 (40.000 por pocillo de una placa de 96 pocillos de base fina y transparente) con sobrenadante de hibridoma durante 1 hora a 37°C, CO₂ al 5%. Tras tres lavados de 5 minutos con albumina sérica bovina (BSA) al 0,1% en solución salina tampón fosfato (PBS), se fijaron las células en paraformaldehído al 2% durante 2 minutos. Se realizó otra ronda de lavados con BSA 0,1% en PBS, y se añadió un anticuerpo secundario anti-conejo de ratón durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitieron los mismos lavados y se añadió durante 1 hora a temperatura ambiente un anticuerpo de cabra anti-ratón, terciario, marcado con FITC. Tras una ronda final de lavados, se almacenaron las células en PBS a 4°C hasta el procesamiento de imágenes. La tinción superficial se visualizó con microscopio en un microscopio Zeiss Axiovert 10 utilizando una lente Neofluar 40X con una abertura numérica de 0,75. Las imágenes se capturaron utilizando un conjunto de filtros de excitación a 480 y un conjunto de filtros de emisión a 535 para FITC. Se puntuó la tinción superficial de las células comparado con un control positivo (anti-integrina β1, Chemicon #MAB1963 y anti-gelsolina Sigma #G4896) y con controles negativos (sin anticuerpo primario).

Ejemplo 2: Construcción de una biblioteca inmunológica

30 Se inmunizaron dos ratones BALB/c por vía intradérmica con 2×10^7 células HT-1080 fijadas en paraformaldehído (línea celular de fibrosarcoma humano; ATCC, CCL-121). Tras la primera inmunización, se repitieron dos veces las inyecciones en un período de 39 días, se sacrificaron los ratones y se aislaron los bazo y se congelaron en nitrógeno líquido.

35 Se aisló el ARNm total utilizando el Kit RNeasy Midi (QIAGEN #75142), según la descripción del fabricante, utilizando la mitad de cada preparación de bazo. La concentración y pureza del ARN se determinó mediante un gel de formaldehído desnaturalizante y determinación fotométrica.

40 Se sintetizó ADNc utilizando 8,9 µg de ARN recién preparado y 10 pmol de una mezcla de cebadores IgG1-c, IgG2a-c, IgG2b-c, IgG3-c, VLL-c, VLK-c) utilizando el Kit Superscript™ II (GibcoBRL Life Technologies #18064-014). Estos cebadores se hibridan al ARN que codifica los genes de la cadena pesada (VH) IgG y los genes de la cadena ligera (VL) de la familia kappa y lambda. Los genes VH se amplificaron mediante PCR a partir de 1 µl de ADNc utilizando 36 combinaciones individuales de 9 cebadores directos (M-VH1, M-VH2, M-VH3, M-VH4, M-VH5, M-VH6, M-VH7, M-VH8, M-VH9) y 4 cebadores inversos (M-JH1, M-JH2, M-JH3, M-JH4) sin sitios de restricción. Los genes VL se amplificaron mediante PCR con una mezcla de cebadores (M-VK1, M-VK2, M-VK3, M-VK4, M-VL1, M-JK1, M-JK2, M-JK3, M-JL1) sin sitios de restricción. Los productos de la PCR se purificaron en gel (Kit de extracción en gel QIAquick, #28706) y se volvieron a amplificar utilizando combinaciones individuales de 9 cebadores directos (MVH1 Sfil, MVH2 Sfil, MVH3 Sfil, MVH4 Sfil, MVH5 Sfil, MVH6 Sfil, MVH7 Sfil, MVH8 Sfil, MVH9 Sfil) y 4 cebadores inversos (M-JH1, Sall, M-JH2 Sall, M-JH3 Sall, M-JH4 Sall) VH y una mezcla de cebadores (M-VK1 ApaL1, M-VK2, ApaL1, M-VK3 ApaL1, M-VK4 ApaL1, M-VL1 ApaL1, M-JK1 NotI, M-JK2 NotI, AM-JK3 NotI, M-JL1 NotI) con sitios de restricción para VL. Los productos de la PCR se purificaron en gel (Kit de extracción en gel QIAquick, #28706) y se clonaron en el vector de expresión en fagos pXP10 utilizando los sitios de restricción *Sfil/Sall* para VH y *ApaL1/NotI* para VL. La mezcla de ligadura se transfectó en *E. Coli* TG-1 mediante electroporación dando lugar a una biblioteca con un tamaño de 10^7 clonas independientes (fagos) que expresan fragmentos de anticuerpos de una cadena diferentes (scFv).

Ejemplo 3: Selección y cribado de scFv (selección en células fijadas)

60 Se seleccionaron cadenas únicas Fv a partir de la biblioteca de expresión en fagos generada a partir de los ratones inmunizados con células HT-1080 fijadas. La biblioteca se generó utilizando el vector de expresión en fagos pXP10.

65 Se seleccionaron los fagos que expresaban scFv con alta afinidad por las células tumorales del modo siguiente: Se recolectaron células HT-1080 con EDTA al 0,05%, se fijaron con paraformaldehído, se diluyeron a una concentración de 1×10^7 células/mL en PBS y se inmovilizaron en pocillos de placas en entrecruzamiento UV de 96 pocillos (Corning Costar). Los pocillos de la placa de entrecruzamiento UV se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% (#70166, Fluka) en PBS (MPBS). Se pre-bloquearon 10^{12} cfu (unidades formadoras de colonias) de la biblioteca

de fagos por 10^6 células durante 1 hora a 25°C con MPBS y a continuación se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente (RT) con las células. Los pocillos la placa de entrecruzamiento UV se lavaron seis veces con PBS + Tween-20 0,05%, seguido de seis lavados con PBS. Los fagos unidos se eluyeron mediante la adición de glicina 10 mM a pH 2,2 y se neutralizaron con Tris/HCl 1M a pH 7,4. Típicamente, se eluyeron entre 10^3 y 10^6 cfu en la primera ronda de selección, por lo tanto la diversidad del repertorio enriquecido disminuye en comparación con el repertorio original. Se amplificó el eluato que contenía el repertorio enriquecido infectando *E. coli* TG 1 en crecimiento exponencial. Se seleccionaron y propagaron los *E. coli* que contenían fagémidos mediante cultivo de una noche (o/n) a 30°C en placas de agar LB suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 1%: Tras esta etapa, el repertorio enriquecido puede o bien ser amplificado como un conjunto policlonal y utilizado para rondas adicionales de selección de forma iterativa hasta conseguir la convergencia hasta las propiedades deseadas o bien separarse espacialmente y cribarse a nivel de clonas individuales. Las partículas de fago para la siguiente ronda de selección se producen mediante una sobre-infección de cultivos en crecimiento exponencial de la ronda anterior de la selección con el fago colaborador VCS-M13 (Stratagene, La Jolla, CA) y dejando crecer los cultivos una noche a 20°C en 2xTY suplementado con 100 µg/mL de ampicilina (amp) y 50 µg/mL de kanamicina (kan). Los fagos preparados tras la selección se precipitaron con NaCl 0,5M /PEG-6000 4% a partir del sobrenadante bacteriano aclarado y se volvieron a suspender en PBS. Se realizó una ronda de selección, seguida del cribado a nivel de clonas individuales, tal como se describe en el ejemplo 4.

Ejemplo 4: Selección y cribado de scFv (Cribado sobre células fijadas)

Para el cribado, se volvieron a clonar en el vector de expresión pXP14 los genes que codifican los scFv seleccionados, contenidos en el vector de expresión en fagos. Este vector dirige la expresión de scFv en fusión con un Strep-tag y un E-tag y no contiene un gen-3 de los fagos filamentosos. Se cultivaron *E. coli* TG1 de colonias individuales conteniendo el vector de expresión, en pocillos individuales de una placa de microtitulación de manera que cada pocillo contenía una sola clona scFv. Las bacterias se cultivaron a 30°C en 2xTY suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 0,1% en placas de microtitulación de 96 pocillos (#9297, TPP) hasta una OD_{600} de 0,7. La expresión se indujo con IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se continuó a 25°C durante una noche. Se prepararon lisados aclarados que contenían Fv de una cadena mediante la adición de lisozima de huevo de gallina (#L-6876, Sigma) a una concentración final de 50 µg/mL durante 1 hora a 25°C y centrifugación durante 15 minutos a 3.000 x g. Previamente al ELISA de cribado, los lisados aclarados se bloquearon mediante la adición de un volumen igual de DMEM + FCS al 10% durante 1 hora. Para el ELISA de cribado, se recogieron las células HT-1080 con EDTA al 0,05%, se fijaron con paraformaldehído, se diluyeron a una concentración de 1×10^7 células/mL en PBS y se inmovilizaron sobre pocillos de una placa de entrecruzamiento UV de 96 pocillos (Corning Costar). Los pocillos de la placa de entrecruzamiento UV se bloquearon con MPBS y se añadieron los lisados aclarados bloqueados conteniendo scFv durante 1,5 horas a 25°C. Las placas se lavaron 2 veces con PBS + Tween-20 0,1% y una vez con PBS, se incubaron con α -E-tag conjugado con HRP (#27-9413-01, Pharmacia Biotech; diluido 1:5.000 en MPBS con Tween-20 al 0,1%) durante 1 hora, se lavaron tres veces con PBS + Tween-20 al 0,1% y tres veces con PBS, se revelaron con POD (#1 484 281, Roche) y se leyeron las señales a 370 nm.

Las clonas positivas se volvieron a analizar frente a células HT-1080 y fibroblastos humanos Hs-27 control (ATCC CRL-1634) utilizando el procedimiento de ELISA de cribado descrito previamente y se conservaron en lotes en glicerol. En un cribado típico, se cribaron 2760 (30x92) clonas en cuanto a su unión a células HT-1080, definiéndose el 5% de clonas positivas como las clonas que daban una señal tras sustracción del fondo $> 0,1$. 155 clonas positivas se re-evaluaron en cuanto a un unión específica a células HT-1080 en comparación con células Hs-27 control, con un 28% de clonas positivas definidas como clonas que daban una señal tras sustracción del fondo en células HT-1080 al menos dos veces el valor de la señal en células Hs-27 control.

Ejemplo 5: Secuenciación y expresión a gran escala

La secuenciación de scFv1 y sus genes se realizó con Sequiserve GmbH, Vaterstetten, Alemania utilizando el cebador pXP2 Seq2 (5'-CCCCACGCGTTCCAGC-3') y pXP2 Seq1 (5'TACCTATTGCCTACGGC-3'). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos se muestran en las figuras.

Las clonas específicas identificadas mediante secuenciación se extrajeron mediante vapor (steamed) de los lotes de glicerol en placas de Agar LB/Amp (100 µg/mL)/glucosa 1% y se incubaron o/n a 30°C. Se inocularon 10 mL de medio LB/Amp/Glu (1%) en una única colonia y se cultivaron o/n a 30°C y con una agitación de 200 rpm. La mañana siguiente, los cultivos de una noche se colocaron en hielo hasta la inoculación de 1 L de medio 2xTY suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 0,1% en matraces Erlenmeyer de 2 L. Se cultivaron las células a 25°C y con agitación hasta alcanzar una OD_{600} de 0,5-0,6 y a continuación se indujeron con IPTG a una concentración final de 0,1 mM. Se añadió ampicilina recién preparada a una concentración de 50 µg/mL e incubó a 22°C o/n con agitación. Por la mañana se centrifugaron los cultivos a 5.000 x g durante 15 minutos a 4°C, se desecharon los sobrenadantes y los precipitados se volvieron a suspender cuidadosamente en hielo con una pipeta en 10 mL de tampón PBS-Na 0,5 M conteniendo inhibidores de proteasa completa (#1697498, Roche), previamente enfriado. Tras completar la resuspensión, se transfirieron las suspensiones de bacterias a tubos de centrifugación Oakridge de 20 mL y se añadió lisozima de huevo de gallina (#L-6876, Sigma) a una concentración final de 50 µg/mL durante

1 hora en hielo. Las bacterias lisadas se centrifugaron a 20.000 x g durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes (lisado) se transfirieron a tubos de plástico de 15 mL. Para la purificación por afinidad, los lisados se cargaron a una velocidad de 1 mL/min en columnas de 1 mL StrepTactin (# 2-1505-010, IBA) equilibradas con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón PBS-Na 0,5M a través de un sistema de purificación de proteínas paralelo. Tras un lavado con 10 CV de PBS se procedió a la elución con 5 CV de PBS/Destiotiotina 5 mM (#D-1411, Sigma) recogiendo fracciones de 1 mL. Se midieron las fracciones de UV₂₈₀, se agruparon las fracciones que contenían proteína y se concentraron con Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices 10.000 MWCO (#UFC801024, Millipore) a 4.700 x g. Se comprobó la pureza de las scFv concentradas con geles SDS-PAGE Bis-Tris 12% teñidos con Azul Coomassie y se congelaron en alícuotas con glicerol al 20% a -80°C.

Ejemplo 6: Análisis FACS de la unión específica a células tumorales.

Para evaluar la capacidad de los scFv anti HT-1080 purificados de unirse específicamente a las células diana, realizamos un análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando células HT-1080 (ATCC CCL-121) y células Hs-27 (10⁶ células/mL) como línea celular de control (ver figuras). Las células se incubaron con 10 µg/mL de scFv puro en CellWash (BD (Becton, Dickinson and Company) #349524) durante 20 minutos a 4°C, se lavaron y se detectaron los scFv unidos con un mAb anti E-tag secundario marcado con FITC (Amersham #27-9412-01). Las muestras se lavaron y analizaron en un analizador FACS de Becton Dickinson. La figura 8 muestra el logaritmo de la intensidad de la fluorescencia (FL1-H; eje x) respecto al número relativo de células (recuentos; eje y) para células que reaccionan con scFv1. La línea delgada representa la línea celular control (HS-27) y la línea gruesa las células HS-1080. scFv1 tiñe específicamente las líneas celulares tumorales con una señal hasta diez veces superior en comparación con la línea celular control.

Ejemplo 7: Marcaje de scFv con FITC

Los scFv se marcaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Molecular Probes, Eugene, USA #F1906) mediante el siguiente método: Se añadieron alícuotas de una solución de 10 mg/mL de FITC en dimetil sulfóxido seco a 100 µg de scFv1 disuelto en PBS/Na-HCO₃ 0,5M, pH 9,5 en una relación 30:1 (FITC:scFv1). La muestra se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con agitación, se separó el FITC libre utilizando columnas desalinizadoras (2 Micro Spin G-25, Pharmacia 27-5325-01). El porcentaje de marcaje se determinó mediante espectrometría de masas y mediante espectrometría UV/VIS, de manera que la concentración de proteína se calculó a 280 nm y la concentración de FITC a 494 nm.

Ejemplo 7.1: Marcaje del mAb 1.5.1 con FITC

Se añadió una solución recién hecha de 10 mg/mL de FITC (Molecular Probes, Eugene, USA #F1906) en dimetil sulfóxido seco en una relación 1:5 al anticuerpo purificado mAb 1.5.1. (T-gel Absorbant, Pierce Biotechnology #20500). Se añadió a la reacción un volumen igual de NaHCO₃ 0,5M, pH 9,5, y se incubó la reacción con balanceo durante dos horas a temperatura ambiente. El FITC libre se separó utilizando una columna desalinizadora (PD-10, Amersham #17-0851-01). El porcentaje se determinó calculando la concentración de FITC mediante espectrometría VIS a 494 nm y asumiendo una recuperación completa de la proteína a partir del marcaje.

Ejemplo 8: Ensayo de capacidad invasora para la identificación de fragmentos de anticuerpo inhibidores.

Se utilizó el sistema ChemoTx® (Neuro Probe Inc.# 106-8, Gaithersburg) en un formato de 96 pocillos como cámara de quimiotaxis/migración celular desechable con filtro de policarbonato pista grabado con un tamaño de poro de 8 µm, diámetro/sitio 5,7 mm.

Se aplicaron al filtro de membrana de la placa de 96 pocillos en las hileras B-H, 13,3 µL de una solución de 0,3 mg/mL de Matrigel (Matrigel es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteína de la matriz extracelular. Su componente principal es la laminina, seguida del colágeno IV, el proteoglicano heparán sulfato, la entactina y el nidogén. También contiene TGF-β, factor de crecimiento de los fibroblastos, activador del plasminógeno tisular, y otros factores de crecimiento que se encuentran de forma natural en el tumor EHS) (Becton Dickenson, BD #356234) diluida en Dulbeccos PBS (Gibco #14040-091) y en la hilera A se diluyeron 1,2 µg/sitio de colágeno S tipo I (Roche #10982929) en HCl (Sigma #945-50) 0,05 M y se incubó durante la noche a 20°C en un desecador para promover la gelificación. Se cultivaron células HT-1080 hasta una confluencia del 70-80% en DMEM suplementado con GlutamaxI (862mg/l (Gibco #31966-021) con un 10% de FCS (Gibco #10270106). Se lavaron las células dos veces con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA (Sigma #A-7030) y a continuación se marcaron in situ con Bisbencimida H 33342 (Sigma #B-2261) y se diluyeron 1:100 en DMEM/GlutamaxI/0.1 % BSA durante 15 min a 37°C, 7,5% CO₂. Se lavaron las células dos veces con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA y se cargaron con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA durante 15 min a 37°C, 7,5% CO₂ para recuperarlas. Tras dos lavados con PBS w/o (agua en aceite) Ca²⁺, Mg²⁺ (Gibco, 10010-015), se desprendieron las células con EDTA 0,5 mM (Sigma #E8008), se recolectaron con Dulbeccos PBS/0,1% BSA/Hepes (Gibco #15630-056) 10mM, se lavaron des veces con Dulbeccos PBS/0,1% BSA/ Hepes 10mM, se suspendieron en Dulbeccos PBS/0,1% BSA/ Hepes 10mM y se diluyeron a una concentración de 6,7 x 10⁶ células/mL con Dulbeccos

PBS/0,1% BSA/ Hepes 10mM. Se incubaron $6,7 \times 10^6$ células/mL en una relación 1:1 con $40 \mu\text{g/mL}$ de un scFv control como control negativo de la inhibición de la invasión y con un scFv específico para HT-1080 durante 1 hora en hielo. Tras diluir hasta una concentración de $6,7 \times 10^5$ células/mL con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA, se pipetearon las células HT-1080 y las diluciones de células HT-1080/scFv por triplicado en la cámara de quimiotaxis (hileras B-H) a una densidad de $3,4 \times 10^4$ células/pocillo y se incubaron durante 6 horas a 37°C , 7,5% CO_2 . Como agente potenciador de la quimiotaxis se utilizó DMEM/GlutamaxI con un 5% de FCS en la cámara inferior. Se realizó una curva estándar entre 1×10^4 y 4×10^4 células/sitio en la hilera A de la cámara de quimiotaxis recubierta de colágeno S tipo I. En la cámara inferior se utilizó DMEM/GlutamaxI/0,1% BSA (las células no migraron). Tras rascar las células que no migraron de la parte superior de la membrana (excepto en la curva estándar de la hilera A) se determinó la fluorescencia de las células que migraron a través de la membrana (de las que no migraron en el caso de la curva estándar), en un lector de microplacas Fluostar Galaxy (bMG) utilizando unas longitudes de onda de excitación/emisión de 370/460 nm.

Ejemplo 9: Ensayo de invasión para la identificación de dianas con CALI

Este ejemplo es en general idéntico al ejemplo 8, excepto porque se utilizaron scFV marcados con FITC (ver, ejemplo 7 para el marcaje) y se integró el proceso CALI dentro del ensayo de invasión.

Se utilizó el sistema ChemoTx® (Neuro Probe Inc.# 106-8, Gaithersburg) en un formato de 96 pocillos como cámara de quimiotaxis/migración celular desechable con un filtro de policarbonato pista grabado con un tamaño de poro de $8 \mu\text{m}$, diámetro/sitio $5,7 \text{ mm}$.

Se aplicaron sobre el filtro de membrana de la placa de 96 pocillos $13,3 \mu\text{l}$ de una solución de $0,3 \text{ mg/ml}$ de Matrigel (ver ejemplo 8) diluida en Dulbeccos PBS (Gibco #14040-091), en las hileras B-H y en la hilera A se diluyeron $1,2 \mu\text{g/sitio}$ de colágeno S tipo I (Roche #10982929) en HCl (Sigma #945-50) $0,05 \text{ M}$ y se incubó durante una noche a 20° en un desecador para promover la gelificación. Se cultivaron células HT-1080 hasta una confluencia del 70-80% en DMEM suplementado con GlutamaxI (862 mg/L) (Gibco #31966-021) con un 10% de FCS (Gibco #10270106). Se lavaron las células dos veces con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA (Sigma #A-7030), a continuación se marcaron in situ con Bisbencimida H 33342 (Sigma #B-2261) y se diluyeron 1:100 en DMEM/GlutamaxI/0.1 % BSA durante 15 min a 37°C , 7,5% CO_2 . Se lavaron las células dos veces con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA y se cargaron con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA durante 15 min a 37°C , 7,5% CO_2 para recuperarlas. Tras dos lavados con PBS w/o (agua en aceite) Ca^{2+} , Mg^{2+} (Gibco, 10010-015), se desprendieron las células con EDTA $0,5 \text{ mM}$ (Sigma #E8008), se recolectaron con Dulbeccos PBS/0,1% BSA/10mM Hepes (Gibco #15630-056), se lavaron dos veces con Dulbeccos PBS/0,1% BSA/10mM Hepes, se suspendieron en Dulbeccos PBS/0,1% BSA/10mM Hepes y se diluyeron a una concentración de $6,7 \times 10^6$ células/mL con Dulbeccos PBS/0,1% BSA/10mM Hepes. Se incubaron $6,7 \times 10^6$ células/mL en una relación 1:1 con $40 \mu\text{g/mL}$ de anticuerpo monoclonal anti-integrina beta I (JB 1, Chemicon #MAB1963) marcado con FITC como control de la inhibición de la invasión tras CALI y con un scFv específico para HT-1080 marcado con FITC 1 hora en hielo. Se pipetearon $1,3 \times 10^5$ células HT-1080/pocillo o células HT-1080/dilución de scFv o Ab por triplicado en dos placas de 96 pocillos, negras, con óptica especial de fondo plano y ultra fino (Costar #3615). Una placa se mantuvo en hielo en la oscuridad mientras que la otra placa se irradió en un bloque de hielo con láser de onda continua a 488 nm ($0,5 \text{ W}$, 30 segundos). Tras diluir a una concentración de $6,7 \times 10^5$ células/mL con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA, se pipetearon las células HT-1080 y las diluciones de células HT-1080/scFv por triplicado (triplicados no irradiados al lado de triplicados irradiados) en la cámara de quimiotaxis (hileras B-H) a una densidad de $3,4 \times 10^4$ células/pocillo y se incubaron durante 6 horas a 37°C , 7,5% CO_2 . Como agente potenciador de la quimiotaxis se utilizó DMEM/GlutamaxI con un 5% de FCS en la cámara inferior. Se realizó una curva estándar entre 1×10^4 y 4×10^4 células/sitio en la hilera A de la cámara de quimiotaxis recubierta de colágeno S tipo I. En la cámara inferior se utilizó DMEM/GlutamaxI/0,1% BSA (las células no migraron). Tras rascar las células que no migraron de la parte superior de la membrana (excepto en la curva estándar de la hilera A) se determinó la fluorescencia de las células que migraron a través de la membrana (las que no migraron en el caso de la curva estándar), en un lector de microplacas Fluostar Galaxy (bMG) utilizando unas longitudes de onda de excitación/emisión de 370/460 nm. En un experimento general, un valor de 45.000 correspondió a una migración del 100% de las células.

Se evaluó el fenotipo invasor de las células HT-1080 comparando su capacidad relativa de invadir la matriz extracelular tumoral (Matrigel) utilizando el sistema de cultivo Transwell descrito previamente. ScFv1 mostró tras CALI un efecto inhibitorio del 46% sobre la invasión de las células HT-1080. En la figura 3 se muestra el resultado del ensayo de invasión con CALI. La figura 3 muestra que CALI convierte scFv1 en un fragmento de anticuerpo inhibitorio.

Ejemplo 9.1: Ensayo de invasión con anticuerpos (por ejemplo mAb 1.5.1) para la identificación de dianas con CALI

Se utilizó el sistema ChemoTx® (Neuro Probe Inc.# 106-8, Gaithersburg) en un formato de 96 pocillos como cámara de quimiotaxis/migración celular desechable con un filtro de policarbonato pista grabado con un tamaño de poro de $8 \mu\text{m}$, diámetro/sitio $5,7 \text{ mm}$.

Se aplicaron sobre el filtro de membrana de la placa de 96 pocillos, 13,3µl de una solución de 0,3mg/ml de Matrigel (ver ejemplo 8) diluida en Dulbeccos PBS (Gibco #14040-091) en las hileras B-H y en la hilera A se diluyeron 0,3 µg/sitio de colágeno de ratón tipo IV (Becton-Dickenson #354233) en HCl (Sigma #945-50) 0,05 M y se incubó durante una noche a 20° en un desecador para promover la gelificación. Se cultivaron células HT-1080 hasta una confluencia del 70-80% en DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales MEM (IX, Gibco #11140050) y Penicilina-Estreptomicina (1x, Gibco #15140122) con un 10% de FBS (Hyclone #SH30070.03). Se lavaron las células una vez con DMEM/aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina (BSA, Sigma #A-7030) y a continuación se marcaron in situ con 3 µM de Cell Tracker Orange (Molecular Probes #C-2927) en DMEM/aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina durante 15 minutos a 37°C, 7,5% CO₂. Se lavaron las células una vez con DMEM/aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina durante 15 minutos a 37°C, 7,5% CO₂ para su recuperarlas. Tras lavar una vez con Solución salina equilibrada de Hank (HBSS) w/o Ca²⁺, Mg²⁺(Gibco #14170112), se desprendieron las células con Versene (Gibco #15040066), se recolectaron con HBSS/ aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina (HBSS, Gibco #14025092), se lavaron 2 veces con HBSS/ aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina, se suspendieron en HBSS/ aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina y se diluyeron a una concentración de 8 x 10⁶ células/mL con HBSS/ aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina. Se incubaron 8 x 10⁶ células/mL en una relación 1:1 con 40 µg/mL de anticuerpo monoclonal anti-integrina beta I (JB 1, Chemicon #MAB1963) marcado con FITC como control de la inhibición de la invasión tras CALI y con mAbs durante 1 hora en hielo. Se pipetearon 3 x 10⁵ células HT-1080/pocillo o células HT-1080/mAbs por triplicado en dos placas transparentes de 96 pocillos (Costar #3370). Una placa se mantuvo en hielo en la oscuridad mientras que la otra placa se irradió en un bloque de hielo con 300W de luz filtrada en azul (Roscolux, #69, Azul Brillante) durante 1 hora. Tras diluir a una concentración de 8 x 10⁵ células/mL con DMEM/aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina, se pipetearon las células HT-1080 y las diluciones de células HT-1080/mAbs por triplicado (triplicados no irradiados al lado de triplicados irradiados) en la cámara de quimiotaxis (hileras B-H) a una densidad de 4 x 10⁴ células/pocillo y se incubaron durante 6 horas a 37°C, 7,5% CO₂. Como agente potenciador de la quimiotaxis se utilizó DMEM con un 5% de FCS en la cámara inferior. Se realizó una curva estándar entre 1 x 10⁴ y 4 x 10⁴ células/sitio en la hilera A de la cámara de quimiotaxis recubierta de colágeno de ratón IV. En la cámara inferior se utilizó DMEM/ aminoácidos no esenciales MEM/0,1 % BSA/aminoácidos MEM/Penicilina-Estreptomicina (las células no migraron). Tras raspar las células que no migraron de la parte superior de la membrana (excepto en la curva estándar de la hilera A), se determinó la fluorescencia de las células que migraron a través de la membrana (las que no migraron en el caso de la curva estándar), en un lector de fluorescencia de placas Tecan Spectrafluor Plus (excitación: 544, emisión: 590nm). Tanto el control positivo que reconoce la integrina β1 (datos no mostrados) como mAb 1.5.1 mostraron una reducción significativa (p < 0,01, prueba t para datos no apareados) de la invasión tras exposición a la luz (datos mostrados en la figura 2). El control negativo (sin anticuerpo) no mostró reducción alguna. Cada barra está normalizada con el control negativo y representa la media + s.e.m. de dos experimentos por triplicado.

40 **Ejemplo 10:** Ensayo de adherencia a la matriz celular

Se recubrieron las hileras B-H de placas de 96 pocillos (TPP #9296) (tratados para cultivo celular) con 1 µg/pocillo de colágeno S tipo I (Roche #10982929) en Dulbeccos PBS (Gibco #14040-091) y en la hilera A los pocillos 10-12 se recubrieron con BSA (Sigma #A-7030) al 2% en Dulbeccos PBS a 4°C durante una noche. Se lavó la placa con Dulbeccos PBS, se bloquearon las hileras B-H y los pocillos 10-12 de la hilera A con BSA al 2% en Dulbeccos PBS durante 1 hora a 37°C y se lavó de nuevo con Dulbeccos PBS. Se cultivaron células HT-1080 hasta una confluencia del 70-80% en DMEM suplementado con GlutamaxI (862 mg/L (Gibco #31966-021) con un 10% de FCS (Gibco #10270106). Se lavaron las células dos veces con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA (Sigma #A-7030), a continuación se marcaron con Bisbencimida H 33342 (Sigma #B-2261) y se diluyeron 1:100 en DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA durante 15 min a 37°C, 7,5% CO₂. Se lavaron las células dos veces con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA y se cargaron con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA durante 15 min a 37°C, 7,5% CO₂ para recuperarlas. Tras dos lavados con PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Gibco, 10010-015), se desprendieron las células con EDTA 0,5 mM (Sigma #ES008), se recolectaron con Dulbeccos PBS/0,1% BSA/Hepes (Gibco #15630-056)10mM, se lavaron dos veces con Dulbeccos PBS/0,1% BSA/ Hepes 10mM, se suspendieron en Dulbeccos PBS/0,1% BSA/ Hepes 10mM y se diluyeron a una concentración de 6,7 x 10⁵ células/mL con Dulbeccos PBS/0,1% BSA/ Hepes 10mM. Se incubaron 6,7 x 10⁶ células/mL en una relación 1:1 con 40 µg/mL de anticuerpo monoclonal anti-integrina beta I (JB1, Chemicon #MAB1963) marcado con FITC como control negativo de la inhibición de la adherencia tras CALI y con un scFv específico para HT-1080 durante 1 hora en hielo. Se pipetearon 1,3 x 10⁵ células HT-1080/pocillo o células HT-1080/dilución de scFv o Ab por triplicado en dos placas de 96 pocillos, negras, con óptica especial de fondo plano y ultra fino (Costar #3615). Una placa se mantuvo en hielo en la oscuridad mientras que la otra placa se irradió en un bloque de hielo con láser de onda continua a 488 nm (0,5 W, 30 segundos). Tras diluir a una concentración de 6,7 x 10⁵ células/mL con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA, se pipetearon las células HT-1080 y las diluciones de células HT-1080/scFv por triplicado (triplicados no irradiados al lado de triplicados irradiados) en la placa recubierta y bloqueada. En la hilera A pocillos 10-12 se pipetearon 6,7 x 10⁵ células/mL con DMEM/GlutamaxI/0,1 % BSA como control de fondo. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C, 7,5% CO₂ y se lavó dos veces con Dulbeccos PBS, de manera que se eliminaron mediante el lavado las células no adheridas. En la hilera A pocillos 1-9 se realizó una

curva estándar entre 1×10^4 y 4×10^4 células/pocillo, en el resto de pocillos se pipetearon 50 μ L de Dulbeccos PBS. Se determinó la fluorescencia de la células adheridas al colágeno S tipo 1 (no adheridas en el caso de la curva estándar), con el lector de microplacas Fluostar Galaxy (bMG) utilizando longitudes de onda de excitación/emisión de 370/460 nm. scFv1 inhibió un 50% la adherencia de las células HT-1080 al colágeno S tipo 1 (datos no mostrados).

Ejemplo 11: Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación de mAbs, se lisaron monocapas confluentes de células HT-1080 utilizando Tris-Cl 1mM, pH 8,0 con cocktail de inhibidores de proteasas (Boehringer Mannheim) durante 15 minutos a 4°C. Se lisaron adicionalmente las células utilizando un homogeneizador dounce durante 5 minutos. Los lisados se pre-adsorbieron durante 1 hora a 4°C con IgG-agarosa anti-ratón (Sigma). Se incubó en líquido ascítico de la clona de hibridoma diana (10 μ L/ 1 mg de extracto celular) durante una noche a 4°C. Se aislaron los complejos anticuerpo-proteína utilizando perlas de IgG anti-ratón-agarosa durante 1 hora a 4°C. Se analizaron las proteínas precipitadas con SDS-PAGE y tinción con Coomassie, y los inmunoprecipitados mAb se analizaron adicionalmente mediante inmunotransferencias con líquido ascítico de la diana.

Para las inmunoprecipitaciones de scFv, se acoplaron scFvs específicos para HT-1080 a StrepTactin Sefarosa (50 μ g/50 μ L de resina) y se añadieron las perlas con scFv lavadas a los lisados aclarados (1 mg de proteína total) durante 2-3 horas a 4°C. Los complejos scFv-diana se eluyeron con 50 μ L de D-destiobiotina 10 mM en PBS Tween- 20 0,1%. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción argéntica.

Ejemplo 12: Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

Para la identificación de mAbs diana, las bandas teñidas con coomassie de los inmunoprecipitados separadas mediante SDS-PAGE, se sometieron a continuación a una digestión en gel. Los fragmentos de péptido tripsinizados se corrieron en un HPLC Surveyor y un espectrómetro de masas LCQ Deca Ion Trap (ThermoFinnigan) con una columna C18 con un nanospray de 75 μ m (New Objectives). Los PMF (fragmentos de masa peptídica) obtenidos se utilizaron para buscar todas las entradas para la especie *Homo Sapiens* en las bases de datos NCBI y SwissProt.

Para la identificación de scFvs diana, las bandas teñidas se cortaron y sometieron a digestión en gel con tripsina. Los fragmentos de péptido se extrajeron de las piezas de gel, de desalinizaron en ZipTip PC18 y los péptidos eluidos se marcaron en una diana MALDI recubierta de Teflon (Applied Biosystems). Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas STR-DE Voyager MALDI (Applied Biosystems) y las masas de péptidos obtenidas se utilizaron para la identificación de proteínas mediante PMF (huella de masa peptídica), buscando todas las entradas para la especie *Homo Sapiens* en las bases de datos NCBI y Swiss-Prot.

Ejemplo 13: Inmunocitoquímica

Para la inmunocitoquímica de proteínas de superficie, se incubó una monocapa confluyente de células HT-1080 (40.000 por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo fino transparente) con sobrenadante de hibridoma durante 1 hora a 37°C/7% CO₂. Tras tres lavados de 5 minutos con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% en solución salina tampón fosfato (PBS), se fijaron las células en paraformadehído al 2% durante 2 minutos. Se realizó otra ronda de lavados con 0,1% BSA/PBS y se añadió un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón marcado con FITC durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitieron los mismos lavados y se añadió un anticuerpo terciario de cabra anti-conejo marcado con FITC durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras una ronda final de lavados, las células se almacenaron en PBS a 4°C hasta el procesamiento de imágenes. La tinción superficial se visualizó con microscopio en un microscopio Zeiss Axiovert 10 utilizando una lente Neofluar 40X con una abertura numérica de 0,75. Las imágenes se captaron utilizando un conjunto de filtros de excitación a 480 y un conjunto de filtros de emisión a 535 para FITC. Los resultados se muestran en las figuras 6, 6.1 y 6.2.

Ejemplo 14: Biotinilación de superficies celulares

La biotinilación de las proteínas de la superficie celular se realizó tal como se describe en Hanwell y otros (J Biol Chem 277:9772). El conjunto biotinilado de superficie y el conjunto intracelular no biotinilado se separaron en un gel SDS-PAGE, y se transfirió para inmunotransferencia con anti-Hsp90 (Stressgen #SPA-830) o alfa-actinina-4 (Martin A. Pollak, Childrens Hospital, Boston, MA). Los resultados se muestran en la figura 7. La Hsp90 muestra una localización tanto superficial (S) como intracelular (IC), pero la alfa-actinina solamente se halla en el conjunto intracelular. El mAb 1.5.1 también muestra una localización superficial e intracelular (datos no mostrados).

Ejemplo 15: Dependencia de la concentración de Novobiocina o ácido Nalidíxico de la invasión de células HT-1080.

Se pre-trataron 8×10^6 células HT-1080/mL durante 1 hora con novobiocina o ácido nalidíxico a las concentraciones mostradas y se realizó un ensayo de invasión, tal como se describe en el ejemplo 9.1. La novobiocina muestra una inhibición dependiente de la dosis ($p < 0,01$ a $>0,5$ mM). El ácido nalidíxico carece de efecto sobre la invasión. La

viabilidad de las células tratadas con novobiocina no se afectó en este ensayo (datos no mostrados). Cada punto de datos está normalizado con el control sin fármaco y representa la media + s.e.m de 2 experimentos por triplicado. Los resultados se muestran en la figura 10.

5 **Ejemplo 16:** Inhibición de la secreción de MMP

10 Se trataron 40.000 células HT-1080 durante 6 horas con novobiocina o ácido nalidíxico a las concentraciones indicadas. Se separó el medio acondicionado de las células tratadas utilizando un gel de SDS-PAGE que contenía 10 mg/mL de gelatina. Se eliminó el SDS del gel utilizando Triton X-100 al 2,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se permitió que las proteínas digirieran la gelatina en tampón de digestión (Tris-Cl₂ 0,1 M, pH 8,0, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ 0,04%) durante 48 horas a 37°C. Se tiñeron los geles con coomassie y se secaron para realizar la densitometría. En paralelo, se tiñeron geles con plata para demostrar la igualdad en la carga de proteínas (datos no mostrados). La actividad de la MMP disminuyó >75% a la concentración máxima de novobiocina analizada sin observarse reducción alguna de la actividad enzimática con el ácido nalidíxico. Los resultados se muestran en la figura 11.

15 **Ejemplo 17:** Acoplamiento covalente de la novobiocina a la sefarosa e inhibición de la actividad de la MMP

20 Este ejemplo demuestra la inhibición de la función de Hsp90 sobre la superficie de las células HT-1080. Se ha demostrado que el tratamiento de las células de fibrosarcoma HT-1080 con novobiocina, un antibiótico cumarínico, reduce la capacidad de las células de invadir una barrera de membrana basal y también reduce significativamente la actividad/secreción de la metaloproteasa de matriz (MMP). Dado que el experimento se lleva a cabo en un período de tiempo corto (6 horas), no puede haber una depleción significativa de las dianas de Hsp90 intracelular.

25 El acoplamiento covalente de la novobiocina a un portador macromolecular como la sefarosa impide la captación celular de la novobiocina y por consiguiente, la inhibición de la Hsp90 intracelular. Marcu y otros han descrito la conjugación de novobiocina con sefarosa (Marcu y otros (2000) J Natl Cancer Inst 92, 242-8; Staudenbauer y Orr (1981) Nucleic Acids Res. 9, 3589-603). En este procedimiento en primer lugar se lava y se hincha la Sefarosa 6B epoxi-activada (Sigma Chemical Co) con agua destilada. Las perlas hinchadas se lavan adicionalmente con un tampón de acoplamiento (carbonato sódico 0,3M, pH 9,5). La novobiocina se acopla formalmente a las perlas mediante incubación con las perlas hinchadas en tampón de acoplamiento durante 20 horas a 37°C. La novobiocina no conjugada se elimina por lavado con tampón de acoplamiento, y los grupos epoxi-activos no unidos restantes se bloquean con etanolamina 1M durante 12 horas a 30°C. Se lleva a cabo un lavado intenso de las perlas utilizando NaCl 0,5M en tampón de acoplamiento, agua destilada, NaCl 0,5M en acetato sódico 0,1M (pH 4,0) para eliminar todo el exceso de novobiocina y etanolamina. A continuación se equilibran las perlas de novobiocina-sefarosa en HEPES 25mM (pH 8,0) con EDTA 1mM, etilen glicol 10% y KCl 200mM a 4°C en la oscuridad.

40 Antes de proceder al experimento de la gelatinasa, se demostró la unión eficiente del conjugado novobiocina-sefarosa a Hsp90 mediante un ensayo de unión in vitro. Se lisaron células HT-1080 en TNESV (Nonidet P-40 1%, EDTA 2mM, y NaCl 100mM, y ortovanadato sódico 1mM) con inhibidores de las proteasas (comprimido, Boehringer Mannheim). Se incubaron 300 µg de este lisado con 100 µL de conjugado de novobiocina-sefarosa durante 1 hora a 4°C. Tras un lavado intensivo con TNESV, se eluyeron las proteínas unidas a las perlas con tampón de carga SDS-PAGE 2x (Tris-HCl 125mM, pH 6,8, 2-mercaptoetanol 10%, SDS 10%, glicerol 10%, y trazas de azul de bromofenol) y ebullición durante 5 minutos. Las proteínas se corrieron en geles de 10% SDS-PAGE. Estos geles o se tiñen con plata o se transfieren a nitrocelulosas para inmunotransferencia con un anticuerpo anti-Hsp90 (AC88, Stressgen, Inc.).

50 Para el ensayo de la gelatinasa, en primer lugar se retiran suavemente células HT-1080 adherente de las placas de cultivo con Versene. Se combinan 5×10^4 células en DMEM sin suero con 0,1 µL, 1 µL o 10 µL de conjugado de novobiocina-sefarosa y se incuban a temperatura ambiente durante una hora en tubos eppendorf siliconados con balanceo suave. En paralelo se realizan muestras control con perlas de sefarosa no conjugadas con novobiocina. Tras esta incubación, las células se transfieren a una placa de 96 pocillos tratada para cultivo tisular y se incuban durante 6 horas a 37°C/5% CO₂. A continuación se combina medio acondicionado de estas muestras con tampón de carga SDS-PAGE 2x (sin 2-mercaptoetanol). Estas muestras se corren en un gel 10% SDS-PAGE con 10 mg/mL de gelatina. A continuación se elimina el SDS del gel incubando con Triton A-100 2,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se permite que las proteínas digieran la gelatina en tampón de digestión (Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, CaCl₂ 5mM, NaN₃ 0,04%) durante 48 horas a 38°C. Se tiñen los geles con coomassie y se secan para realizar la densitometría. En paralelo, se tiñen geles con plata para demostrar la igualdad en la carga de proteínas (datos no mostrados). La actividad de la MMP disminuye con cantidades crecientes de novobiocina-sefarosa.

60 **Ejemplo 18:** Inhibición de la actividad de la MMP por geldanamicina y geldanamicina inmovilizada (perlas-GA)

65 Pudo demostrarse que la metaloproteinasas de la matriz MMP2 co-inmunoprecipitaba con Hsp90α a partir de medio acondicionado por HT-1080 (Figura 17). A continuación aplicamos un inhibidor conocido de la Hsp90, la geldanamicina, a células HT-1080 para evaluar si la inhibición de la Hsp90 reducía la actividad de la MMP2. Se

trataron células HT-1080 con geldanamicina (GA) 20 μ M en medio libre de suero y se ensayó la MMP2 secretada mediante zimografía. La actividad MMP2 (gelatinasa de 72 kDa) disminuyó aproximadamente un 35%; $p < 0,01$ tras el tratamiento con GA. El contenido total en el medio acondicionado se visualizó mediante tinción argéntica para garantizar una carga igual (ver, figura 18).

5

La geldanamicina es un inhibidor de la Hsp90 capaz de entrar en la célula bien conocido. El tratamiento con geldanamicina (GA) 10 μ M durante 1 hora provocó una disminución significativa de aproximadamente el 35% ($p < 0,05$ prueba t) de la invasión por células HT-1080 que se eliminó cuando se añadió MMP2 activada (100 ng) (datos no mostrados). Dada su permeabilidad celular, la geldanamicina no puede discriminar la localización intracelular y extracelular de la Hsp90. Para demostrar el papel de la Hsp90 extracelular en la invasión de las células tumorales, se inmovilizó la geldanamicina sobre perlas de agarosa (perlas-GA) para evitar que cruzase la membrana plasmática (ver, Whitesell y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 91, 8324-8 (1994)) para los detalles experimentales). Tras el tratamiento de las células HT-1080 con perlas-GA, se observó una reducción del 80% de la MMP2 activa en el medio acondicionado pero solamente una reducción del 15% de la pro-MMP2 (figura 19). Las células HT-1080 tratadas con perlas-GA mostraron una reducción significativa del 45% en su capacidad invasora ($p < 0,01$; prueba t) utilizando un ensayo de invasión in vitro (ver, ejemplo 8). Las perlas no tratadas también inhibían la invasión hasta cierto punto ($< 15\%$), probablemente debido a un bloqueo físico de los poros por las perlas. (ver figura 20). Todos estos resultados sugieren conjuntamente un mecanismo en el que la unión extracelular de la Hsp90 α a la proMMP2 contribuye a la activación de la proteasa, dando lugar a un fenotipo invasor. La inhibición de la Hsp90 α provoca una reducción de la MMP-2 activa y una disminución de la capacidad invasora de las células tumorales.

10

15

20

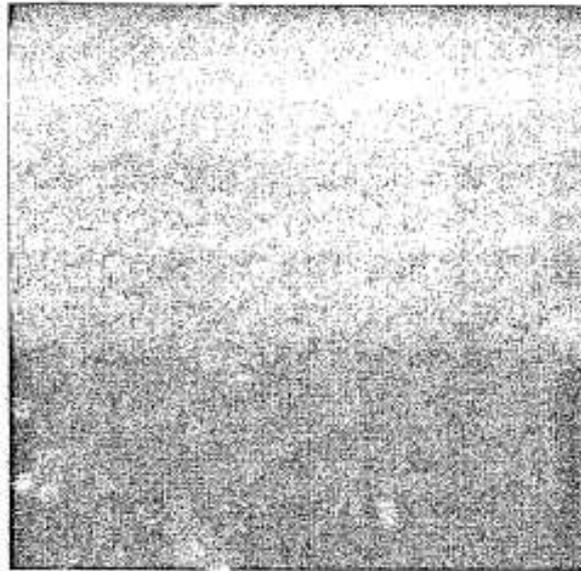
REIVINDICACIONES

- 5 1. Inhibidor de la Hsp90 extracelular humana seleccionado entre anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que pueden unirse a la Hsp90 extracelular humana, para su utilización en un método para prevenir y/o tratar el cáncer o las metástasis.
- 10 2. Inhibidor, según la reivindicación 1, en el que el inhibidor trata o previene la invasión y/o el potencial metastásico de las células cancerosas.
- 15 3. Inhibidor, según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es un anticuerpo.
4. Inhibidor, según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es un anticuerpo monoclonal.
5. Inhibidor, según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es un fragmento de anticuerpo.
- 20 6. Inhibidor, según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es un fragmento de anticuerpo, seleccionado del grupo formado por scFv, dsFv, Fab', Fab, F(ab')₂, Fv, anticuerpo de dominio único y diacuerpo.
7. Inhibidor, según la reivindicación 1, en el que el inhibidor se marca con un marcador detectable.
- 25 8. Inhibidor, según la reivindicación 1, en el que el inhibidor reduce la actividad y/o la secreción de las metaloproteasas de la matriz (MMP).
9. Utilización de un inhibidor de la Hsp90 extracelular humana para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento del cáncer o las metástasis, en la que el inhibidor se selecciona del grupo formado por anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que pueden unirse a la Hsp90 extracelular humana.
- 30 10. Utilización, según la reivindicación 9, en el que el inhibidor trata o previene la invasión y/o el potencial metastásico de las células cancerosas.
11. Utilización, según la reivindicación 9, en el que el inhibidor es un anticuerpo.
12. Utilización, según la reivindicación 9, en el que el inhibidor es un anticuerpo monoclonal.
- 35 13. Utilización, según la reivindicación 9, en el que el inhibidor es un fragmento de anticuerpo.
14. Utilización, según la reivindicación 9, en el que el inhibidor es un fragmento de anticuerpo, seleccionado del grupo formado por scFv, dsFv, Fab', Fab, F(ab')₂, Fv, anticuerpo de dominio único y diacuerpo.
- 40 15. Utilización, según la reivindicación 9, en el que el inhibidor se marca con un marcador detectable.
16. Utilización, según la reivindicación 9, en el que el inhibidor reduce la actividad y/o la secreción de las metaloproteasas de la matriz (MMP).
- 45 17. Molécula de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la Hsp90 extracelular humana para su utilización en un método para prevenir y/o tratar el cáncer o las metástasis, en el que el inhibidor es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que puede unirse a la Hsp90 extracelular humana.
- 50 18. Utilización, para determinar el potencial invasor de muestras biológicas, de un kit que comprende un inhibidor, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y contenedores de análisis adecuados.
19. Utilización, según la reivindicación 18, en la que la muestra biológica incluye un cáncer.
- 55 20. Utilización, según la reivindicación 18, en la que el inhibidor está marcado.
21. Método de cribado o análisis de la invasión y/o el comportamiento metastásico de células *ex vivo*, que comprende las etapas de:
- 60 a) poner en contacto las células con uno o más inhibidores de la Hsp90 bajo condiciones que impiden la captación celular de dicho inhibidor, siendo dicho inhibidor un anticuerpo o fragmento de anticuerpo;
- b) analizar la migración de las células tratadas según la etapa a);
- c) comparar la migración de las células según la etapa a) con células no tratadas; y
- d) opcionalmente determinar el porcentaje de migración en comparación con células no tratadas.

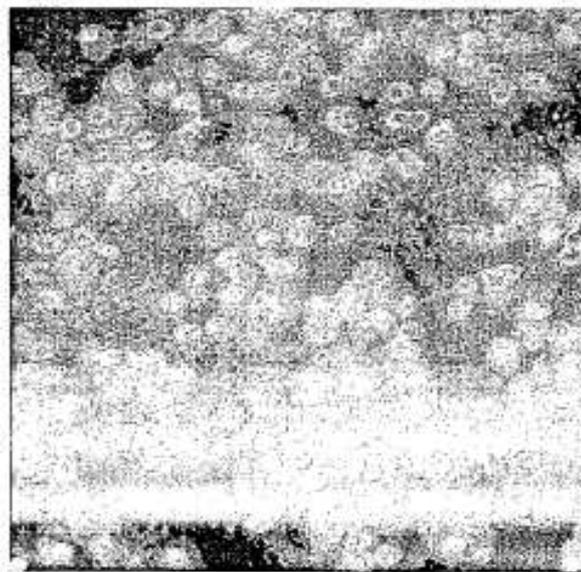
22. Método, según la reivindicación 21, en el que la etapa a) comprende además la etapa de poner en contacto las células con una matriz tipo gel bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de las células y la etapa b) comprende la etapa de analizar la migración de las células a través de la matriz tipo gel.

5 23. Composición farmacéutica para su utilización en un método para prevenir y/o tratar el cáncer o las metástasis, que comprende un inhibidor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

FIGURAS



Hs-27



HT1080

Fig. 1

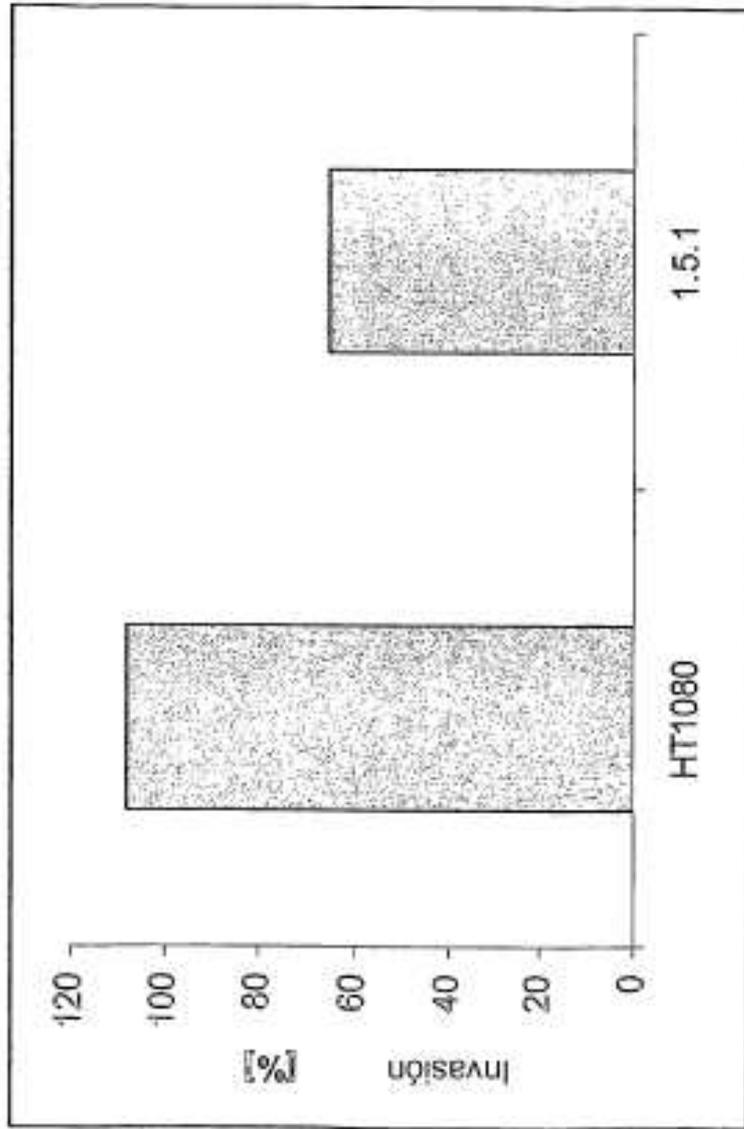


Fig. 2

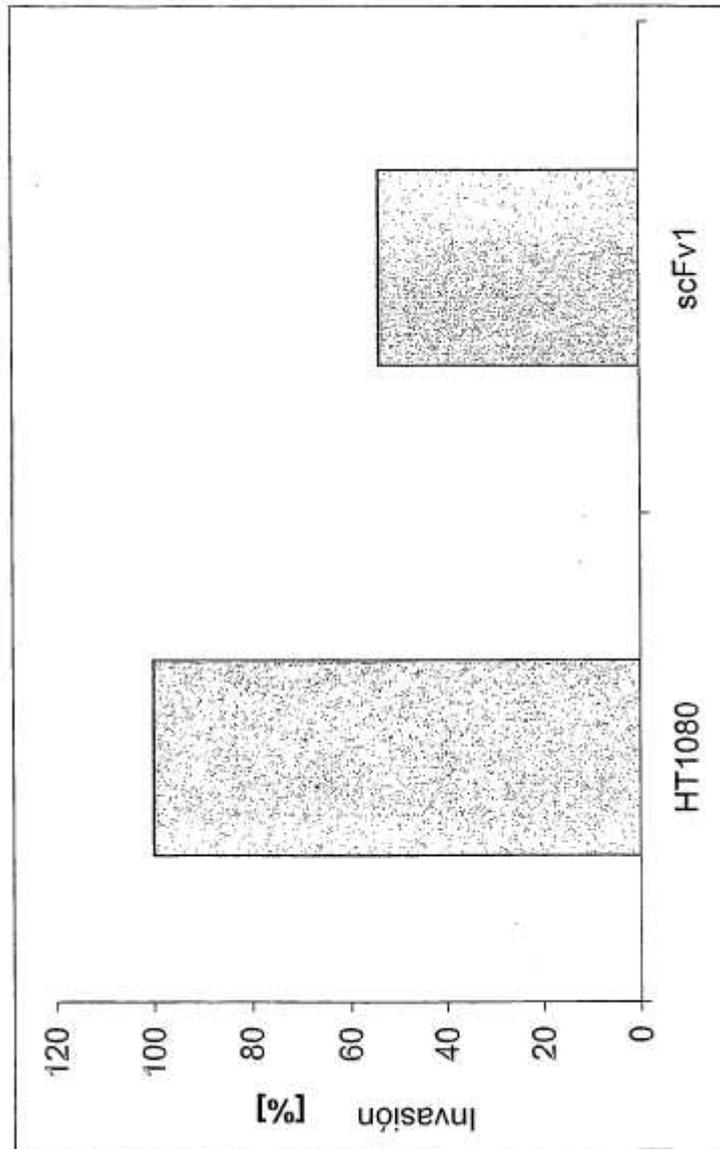


Fig. 3

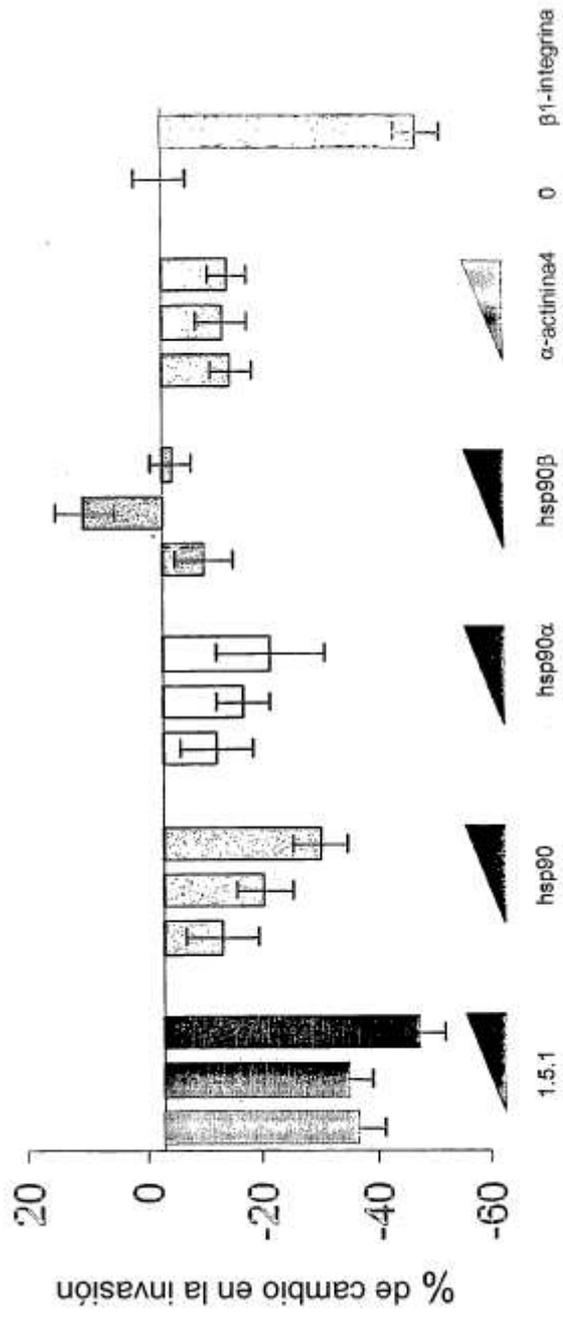


Fig. 4

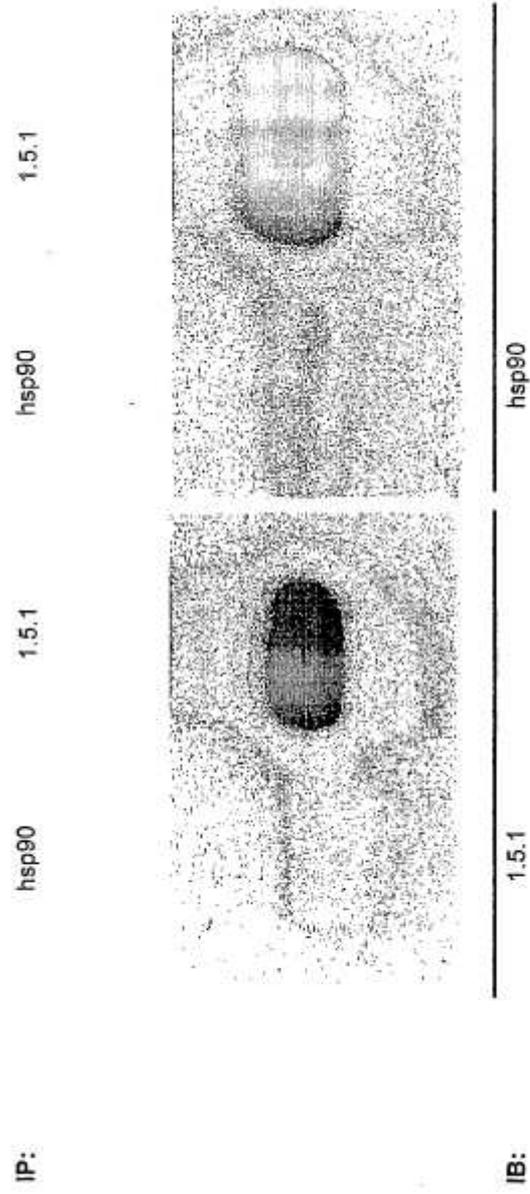


Fig. 5

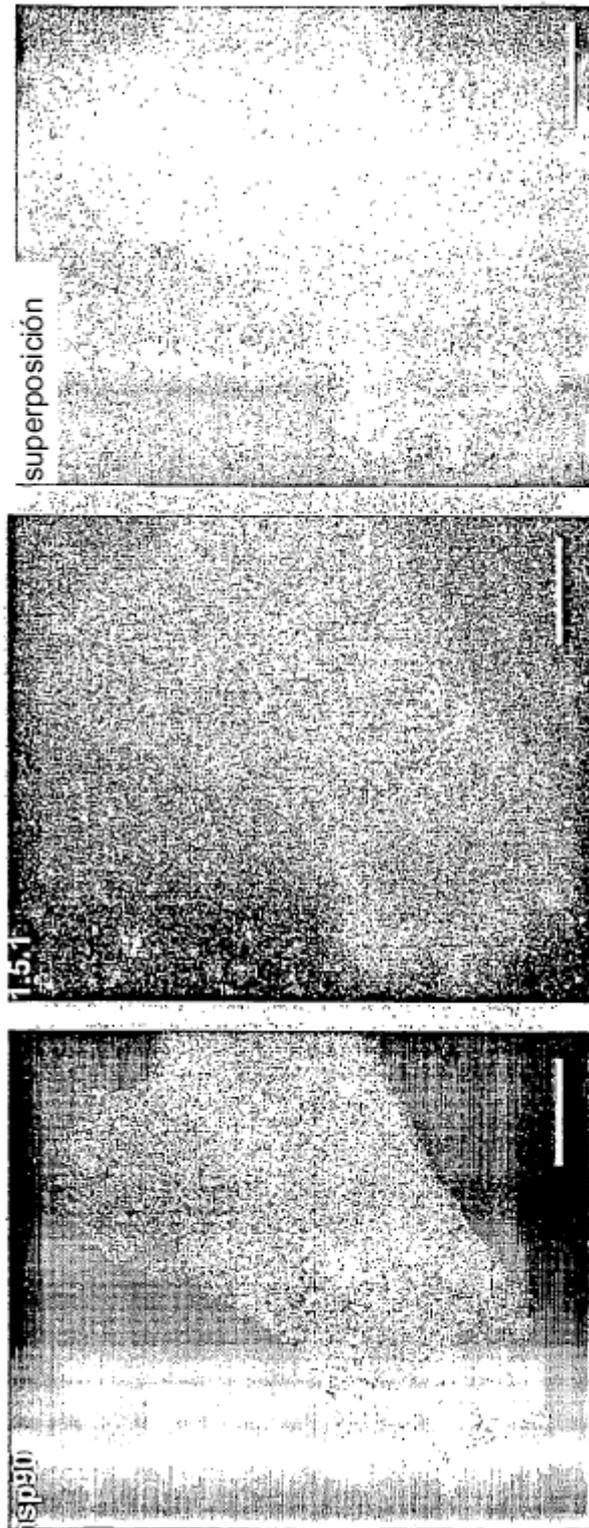


Fig. 6

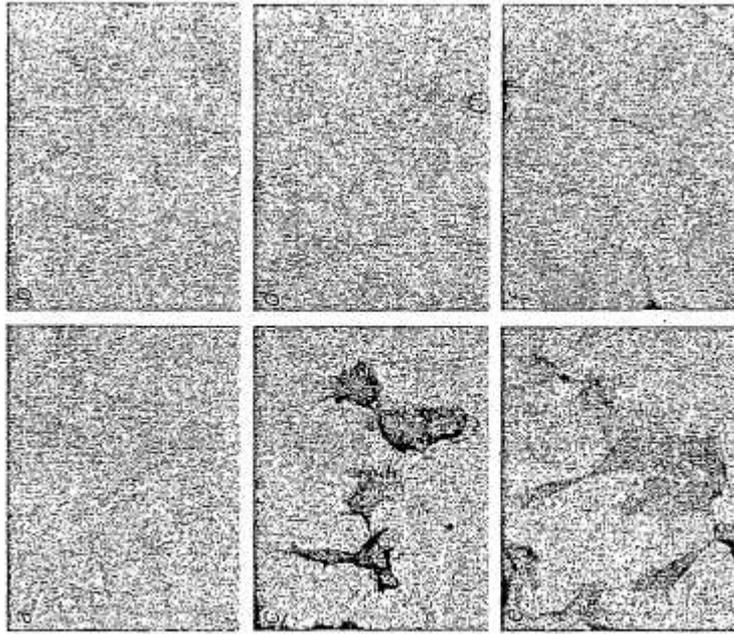


Fig. 6.1

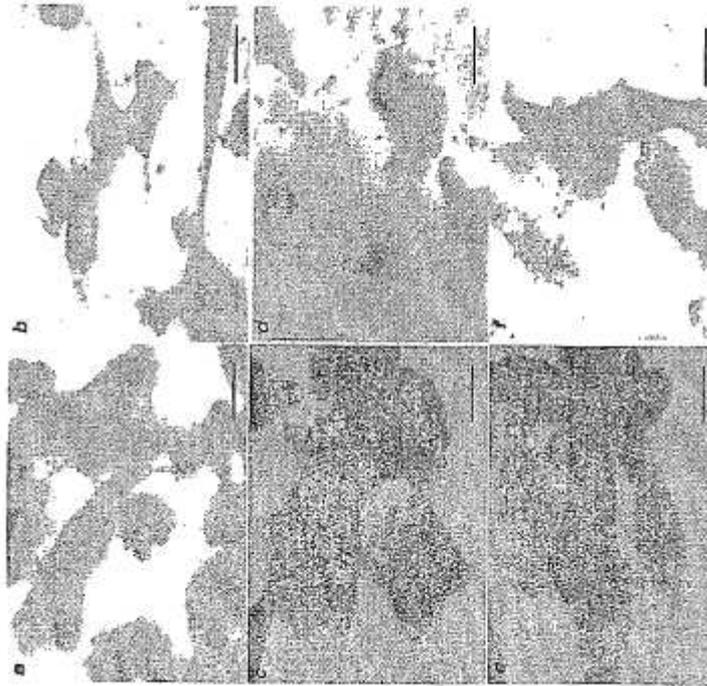


Fig. 6.2

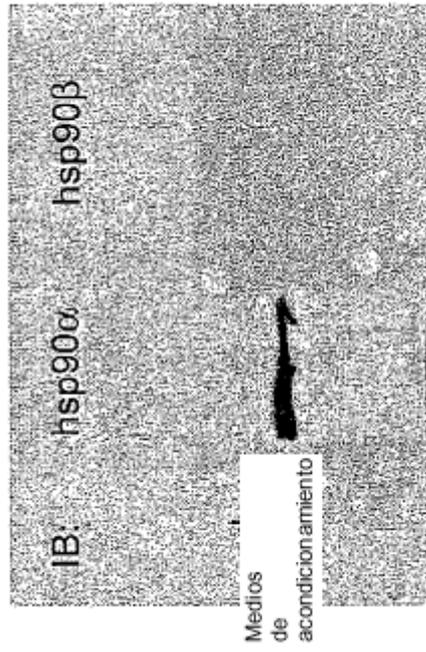


Fig. 6.3

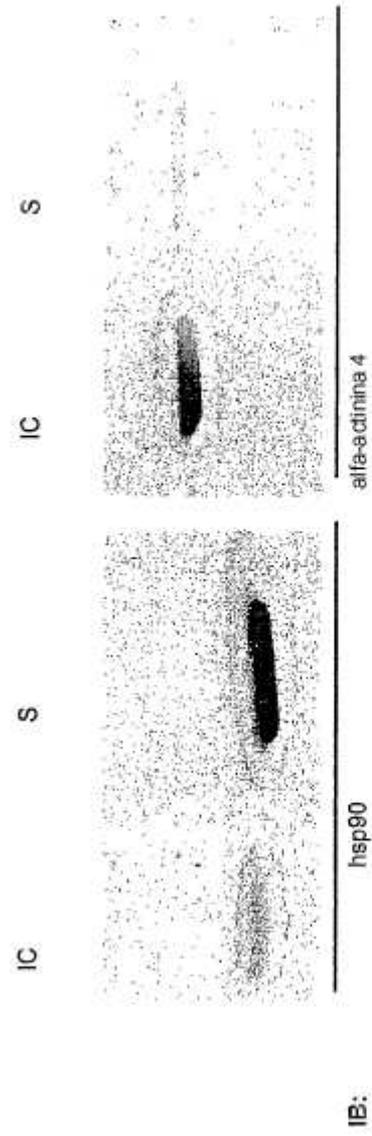


Fig. 7

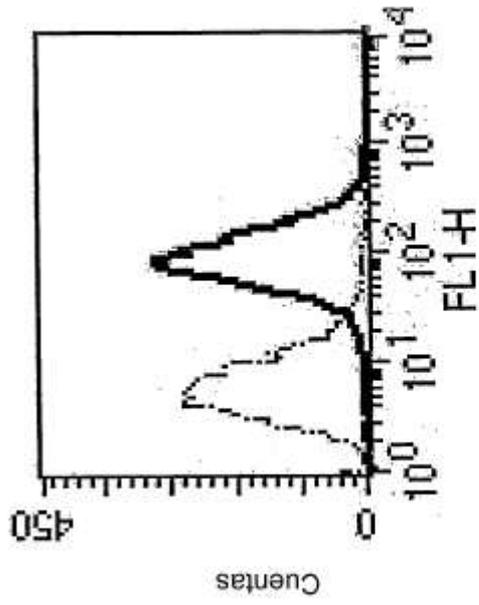


Fig. 8

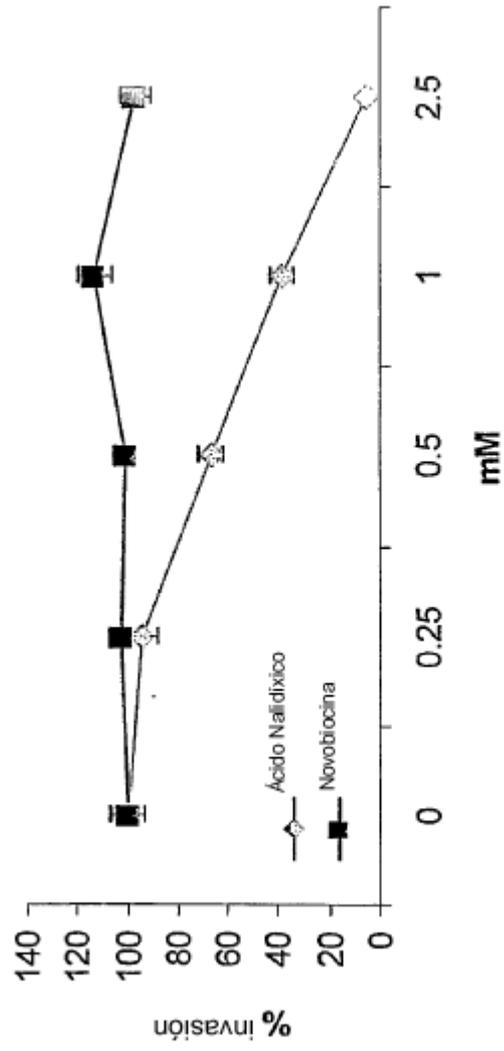


Fig. 10

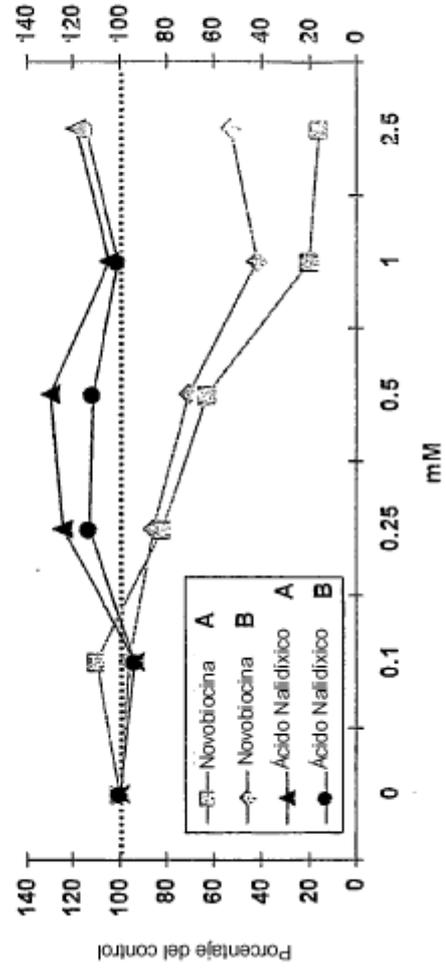
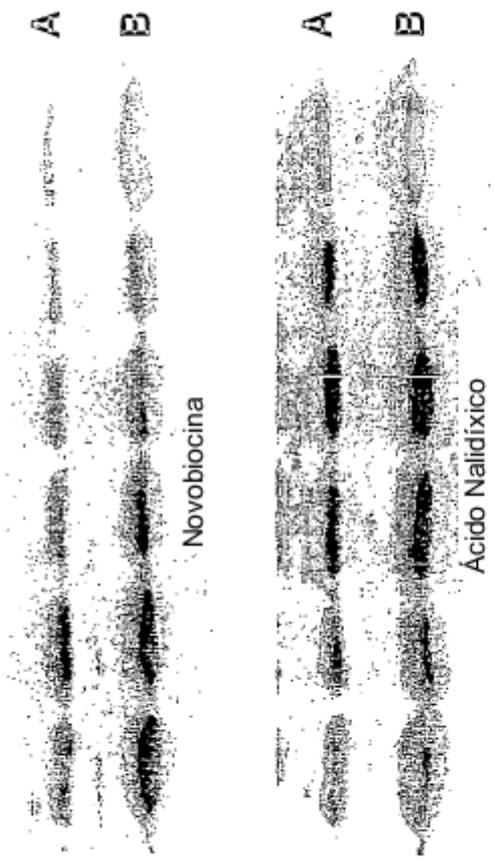


Fig. 11

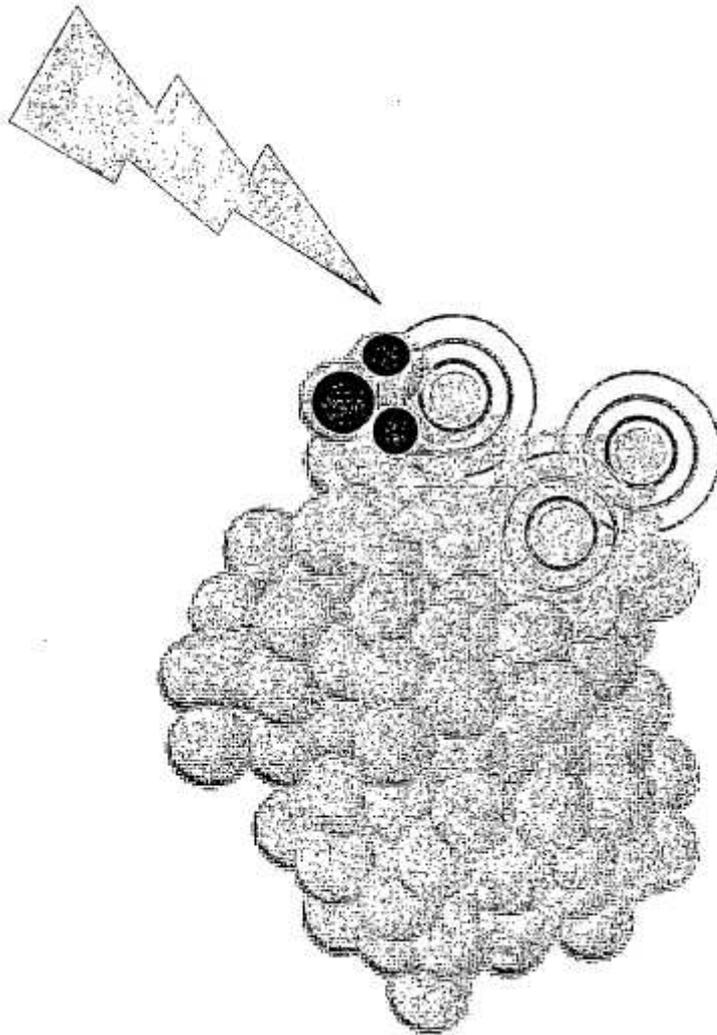
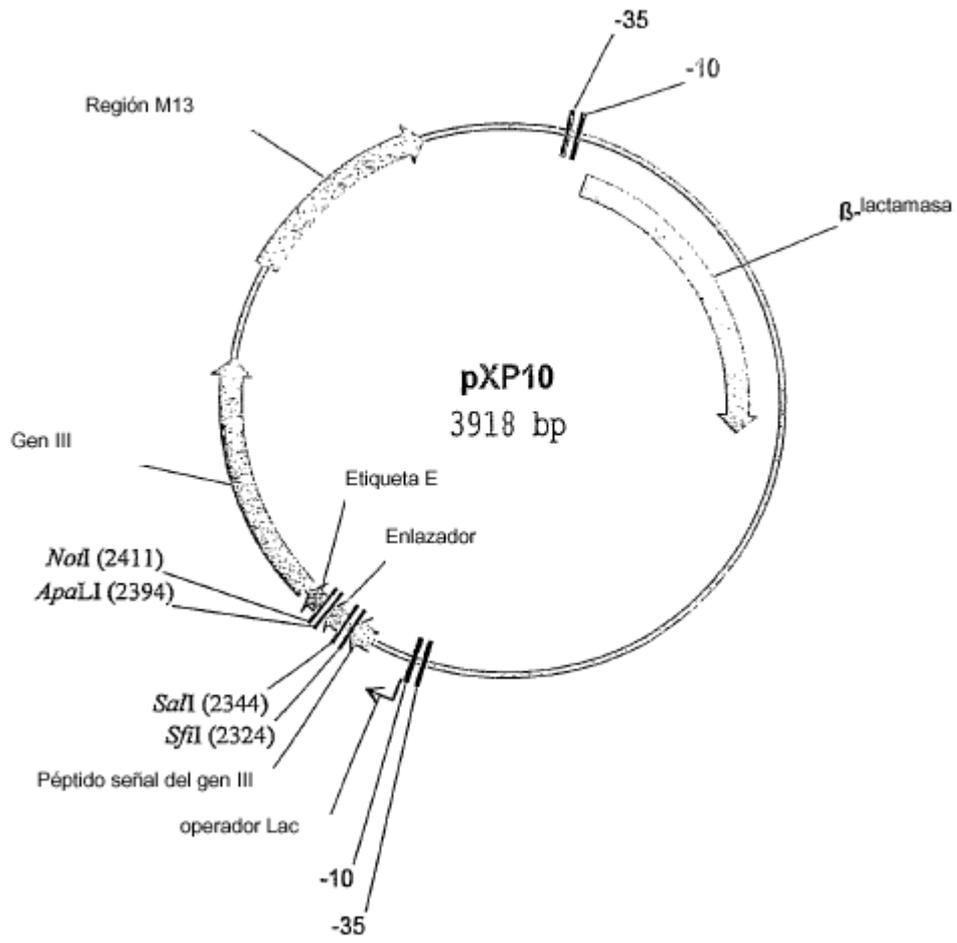


Fig. 12



Secuencia de nucleótidos de pXP10

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA
   CTGCTTTCCC GGAGCACTAT GCGGATAAAA ATATCCAATT ACAGTACTAT
51  ATAATGGTTT CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG
   TATTACCAA GAATCTGCAG TCCACCGTGA AAAGCCCCTT TACACGCGCC
101 AACCCCTATT TGTTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA
   TTGGGGATAA ACAAATAAAA AGATTTATGT AAGTTTATAC ATAGGCGAGT
151 TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA AAGGAAGAGT
   ACTCTGTTAT TGGGACTATT TACGAAGTTA TTATAACTTT TTCCTTCTCA
201 ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCTTTT TTGCGGCATT
   TACTCATAAG TTGTAAAGGC ACAGCGGGAA TAAGGGAAAA AACGCCGTAA
251 TTGCCTTCC TTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
   AACGGAAGGA CAAAACGAG TGGGTCTTTG CGACCCTTT CATTTCTAC
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCT CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC
   GACTTCTAGT CAACCCACGA GCTCACCCAA TGTAGCTTGA CCTAGAGTTG
351 AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT
   TCGCCATTCT AGGAACTCTC AAAAGCGGGG CTTCTTGCAA AAGGTTACTA
401 GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG
   CTCGTGAAAA TTFCAAGACG ATACACCGCG CCATAATAGG GCATAACTGC
451 CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
   GGCCCGTTCT CGTTGAGCCA GCGCGTATG TGATAAGAGT CTTACTGAAC
501 GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT
   CAACTCATGA GTGGTCAGTG TCTTTTCGTA GAATGCCCTAC CGTACTGTCA
551 AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
   TTCTCTTAAT ACGTCACGAC GGTATTGGTA CTCACTATTG TGACGCCGGT
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG
   TGAATGAAGA CTGTTGCTAG CCTCTGGCT TCCTCGATTG GCGAAAAAAC
651 CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGG AACCCGAGCT
   GTGTTGTACC CCCTAGTACA TTGAGCGGAA CTAGCAACCC TTGGCCTCGA
701 GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA
   CTTACTTCGG TATGGTTTGC TGCTCGCACT GTGGTGCTAC GGACATCGTT
751 TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAAGTG GCGAACTACT TACTCTAGCT
   ACCGTTGTTG CAACGCGTTT GATAATTGAC CGCTTGATGA ATGAGATCGA
801 TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG TTGCAGGACC
   AGGGCCGTTG TTAATTATCT GACCTACCTC CGCCTATTTT AACGTCCTGG
851 ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
   TGAAGACGCG AGCCGGAAG GCCGACCGAC CAAATAACGA CTATTTAGAC
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT
   CTCGGCCACT CGCACCCAGA GCGCCATAGT AACGTCGTGA CCCCAGTCTA
951 GGTAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC
   CCATTCGGGA GGGCATAGCA TCAATAGATG TGCTGCCCT CAGTCCGTTG
1001 TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA
   ATACCTACTT GCTTTATCTG TCTAGCGACT CTATCCACGG AGTGACTAAT
1051 AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT CATATATACT TTAGATTGAT
   TCGTAACCAT TGACAGTCTG GTTCAAATGA GTATATATGA AATCTAACTA
1101 TTAAAACCTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA TCCTTTTTGA
   AATTTTGAAG TAAAAATTAA ATTTTCTTAG ATCCACTTCT AGGAAAAACT
1151 TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
   ATTAGAGTAC TGTTTTTAGG GAATTGCACT CAAAAGCAAG GTGACTCGCA
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG
   GTCTGGGGCA TCTTTTCTAG TTTCCTAGAA GAACTCTAGG AAAAAAGAC
1251 CGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCCTAC CAGCGGTGGT
   GCGCATTAGA CGACGAACGT TTGTTTTTTT GGTGGCGATG GTCGCCACCA
1301 TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAAGTGGCT
   AACAAACGGC CTAGTTCTCG ATGGTTGAGA AAAAGGCTTC CATTGACCGA
1351 TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA

```

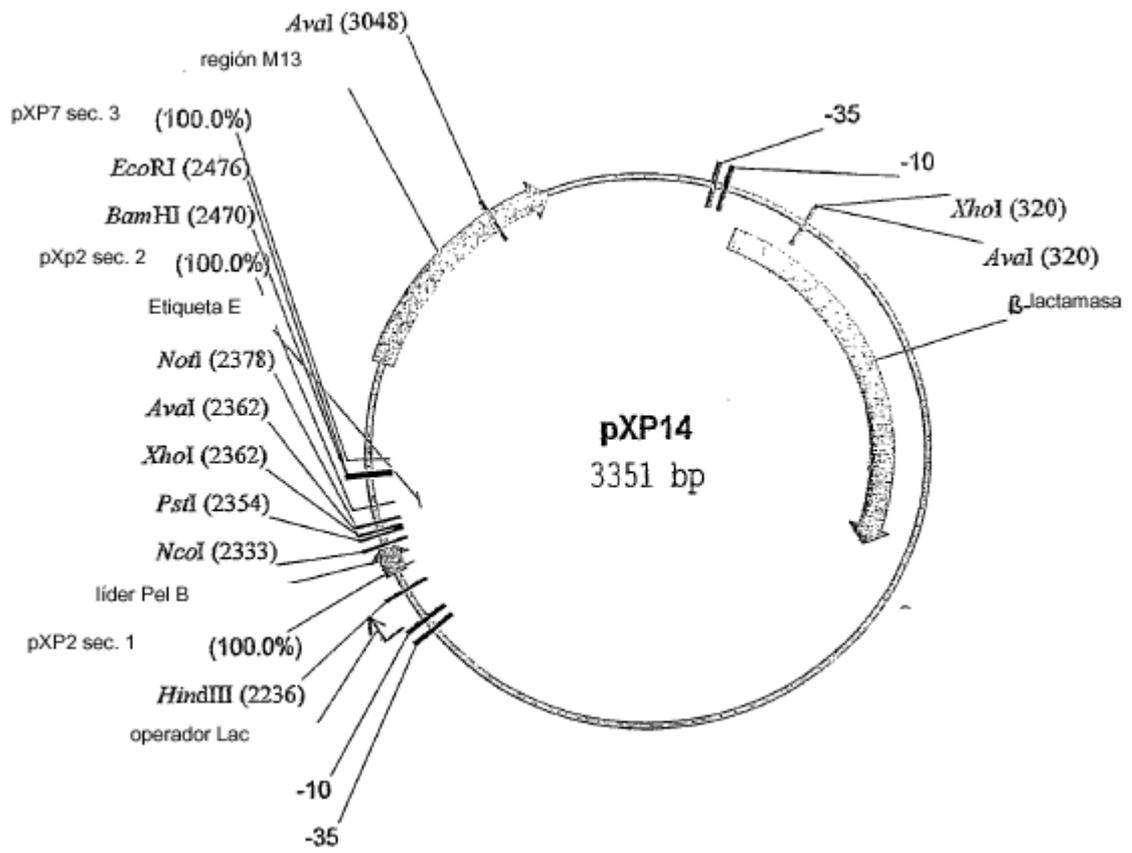
	AGTCGTCTCG	CGTCTATGGT	TTATGACAGG	AAGATCACAT	CGGCATCAAT
1401	GGCCACCACT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATAACC	TCGCTCTGCT
	CCGGTGGTGA	AGTTCTTGAG	ACATCGTGGC	GGATGTATGG	AGCGAGACGA
1451	AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG	TGCTTTACCG
	TTAGGACAAT	GGTCACCGAC	GACGGTCACC	GCTATTCAGC	ACAGAATGGC
1501	GGTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCCGATA	AGGCGCAGCG	GTCGGGCTGA
	CCAACCTGAG	TTCTGCTATC	AATGGCCTAT	TCCGCGTCGC	CAGCCCGACT
1551	ACGGGGGGTT	CGTGCATACA	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACACCGA
	TGCCCCCAA	GCACGTATGT	CGGGTCGAAC	CTCGCTTGCT	GGATGTGGCT
1601	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG	AGCTATGAGA	AAGCGCCACG	CTTCCCCAAG
	TGACTCTATG	GATGTGCGAC	TCGATACTCT	TTCGCGGTGC	GAAGGGCTTC
1651	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGGTAAGCG	GCAGGGTCGG	AACAGGAGAG
	CCTCTTTCCG	CCTGTCCATA	GGCCATTTCG	CGTCCAGCC	TTGTCCCTC
1701	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT	ATAGTCCCTGT
	GCGTGTCCC	TCGAAGGTCC	CCCTTTGCGG	ACCATAGAAA	TATCAGGACA
1751	CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTGTGA	TGCTGTGCTAG
	GCCCAAAGCG	GTGGAGACTG	AACTCGCAGC	TAAAAAACT	ACGAGCAGTC
1801	GGGGGCGGAG	CCTATGGAAA	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT	TTTACGGTTC
	CCCCCGCTC	GGATACCTTT	TTGCGGTTCG	TGCGCCGAA	AAATGCCAAG
1851	CTGGCTTTT	GCTGGCCTTT	TGCTCACATG	TTCTTTCTG	CGTTATCCCC
	GACCGGAAA	CGACCGGAAA	ACGAGTGTAC	AAGAAAGGAC	GCAATAGGGG
1901	TGATTCTGTG	GATAACCGTA	TTACCCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC
	ACTAAGACAC	CTATTGGCAT	AATGGCGGAA	ACTCACTCGA	CTATGGCGAG
1951	GCCGCAGCCG	AACGACCGAG	CGCAGCGAGT	CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA
	CGGCGTCGGC	TTGCTGGCTC	GCGTCGCTCA	GTCACTCGCT	CCTTCGCCCTT
2001	GAGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC	CGATTCAATTA
	CTCGCGGGTT	ATGCGTTTGG	CGGAGAGGGG	CGCGCAACCG	GCTAAGTAAT
2051	ATGCAGCTGG	CACGACAGGT	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA
	TACGTCGACC	GTGCTGTCCA	AAGGGCTGAC	CTTTCGCCCC	TCACTCGCGT
2101	ACGCAATTA	TGTGAGTTAG	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC
	TGCGTTAATT	ACACTCAATC	GAGTGAGTAA	TCCGTGGGGT	CCGAAATGTG
2151	TTTATGCTTC	CGGCTCGTAT	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT
	AAATACGAAG	GCCGAGCATA	CAACACACCT	TAACACTCGC	CTATTTGTTAA
2201	TCACACAGGA	AACAGCTATG	ACCATGATTA	CGCCAAGCTT	TGGAGCCTTT
	AGTGTGTCTT	TTGTGATATC	TGGTACTAAT	GCGGTTCGAA	ACCTCGGAAA
2251	TTTTTGGAGA	TTTTCAACGT	GAAAAAATTA	TTATTCGCAA	TTCTTTTAGT
	AAAAACCTCT	AAAAGTTGCA	CTTTTTTAAT	AATAAGCGTT	AAGGAAATCA
2301	TGTTCCCTTC	TATGCGGCC	AGCCGGCCAT	GGCCAGGTC	CAGTCGACAG
	ACAAGGAAAG	ATACGCCGGG	TCGGCCGGTA	CCGGGTCCAG	GTCAGCTGTC
2351	GTGGAGGCGG	TTCAGGCGGA	GGTGGCTCTG	GCGGTGGCGG	AAGTGCCTC
	CACCTCCGCC	AAGTCCGCCT	CCACCGAGAC	CGCCACCGCC	TTACAGTGAG
2401	ATCAAACGGC	GGCCGCAGGT	GCGCCGGTGC	CGTATCCGGA	TCCGCTGGAA
	TAGTTTGCCG	CCGGCGTCCA	CGCGGCCACG	GCATAGGCCT	AGGCGACCTT
2451	CCGCGTGCCG	CATAGGCTGG	CGGCGGCTCT	GGTGGTGGTT	CTGGTGGCCG
	GGCGCACGGC	GTATCCGACC	GCCGCCGAGA	CCACCACCAA	GACCACCGCC
2501	CTCTGAGGGT	GGCGGCTCTG	AGGGTGGCGG	TTCTGAGGGT	GGCGGCTCTG
	GAGACTCCCA	CCGCCGAGAC	TCCCACCGCC	AAGACTCCCA	CCGCCGAGAC
2551	AGGGTGGCGG	TTCCGGTGGC	GGCTCCGGTT	CCGGTGATTT	TGATTTATGAA
	TCCCACCGCC	AAGGCCACCG	CCGAGGCCAA	GGCCACTAAA	ACTAATACTT
2601	AAAATGGCAA	ACGCTAATAA	GGGGGCTATG	ACCGAAAATG	CCGATGAAA
	TTTTACCGTT	TGCGATTATT	CCCCGATAC	TGGCTTTTAC	GGCTACTTTT
2651	CGCGCTACAG	TCTGACGCTA	AAGGCAAACT	TGATTCGTGC	GCTACTGATT
	GCGCGATGTC	AGACTGCGAT	TTCCGTTTGA	ACTAAGACAG	CGTACACTAA
2701	ACGGTGTCTG	TATCGATGGT	TTCATTGGTG	ACGTTTCCGG	CCTTGCTAAT
	TGCCACGACG	ATAGCTACCA	AAGTAACCAC	TGCAAAGGCC	GGAACGATTA
2751	GGTAATGGTG	CTACTGGTGA	TTTTGCTGGC	TCTAATTCCC	AAATGGCTCA

```

2801 CCATTACCAC GATGACCACT AAAACGACCG AGATTAAGGG TTTACCGAGT
AGTCGGTGAC GGTGATAATT CACCTTTAAT GAATAATTTT CGTCAATATT
TCAGCCACTG CCACTATTAA GTGGAAATTA CTTATTAAAG GCAGTTATAA
2851 TACCTTCTTT GCCTCAGTCG GTTGAATGTC GCCCTTATGT CTTGGCGCT
ATGGAAAGAA CGGAGTCAGC CAACTTACAG CGGGAATACA GAAACCGCGA
2901 GGTA AACCAT ATGAATTTTC TATTGATTGT GACAAAATAA ACTTATCCG
CCATTTGGTA TACTTAAAAG ATA ACTAACA CTGTTTATT TGAATAAGGC
2951 TGGTGTCTTT GCGTTTCTTT TATATGTTGC CACCTTTATG TATGTATTTT
ACCACAGAAA CGCAAAGAAA ATATACAACG GTGGAAATAC ATACATAAAA
3001 CGACGTTTGC TAACATACTG CGTAATAAGG AGTCTTAATA AGAATTCACT
GCTGCAAACG ATTGTATGAC GCATTATTCC TCAGAATTAT TCTTAAGTGA
3051 GGCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCTGGC GTTACCCAAC
CCGGCAGCAA AATGTTGCAG CACTGACCOCT TTTGGGACCG CAATGGGTTG
3101 TTAATCGCCT TGCAGCACAT CCCCCTTTCG CCAGCTGGCG TAATAGCGAA
AATTAGCGGA ACGTCGTGTA GGGGGAAAGC GGTGACCGC ATTATCGCTT
3151 GAGGCCGCGA CCGATCGCCC TTCCCAACAG TTGCGCAGCC TGAATGCGCA
CTCCGGGCGT GGCTAGCGGG AAGGGTTGTC AACGCGTCGG ACTTACCGCT
3201 ATGGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC
TACCGCGGAC TACGCCATAA AAGAGGAATG CGTAGACACG CCATAAAGTG
3251 ACCGCATACG TCAAAGCAAC CATAGTACGC GCCCTGTAGC GGCATTAAT
TGGCGTATGC AGTTTCGTTG GTATCATGCG CGGGACATCG CCGCGTAATT
3301 GCCC GGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCCTAC ACTTGCCAGC
CGGGCCGCC ACACCACAA TGCGCGTCGC ACTGGCGATG TGAACGCTCG
3351 GCCCTAGCCC CCGCTCCTTT CGCTTCTTTC CCTTCTTTC TCGCCACGTT
CGGGATCGGG GCGGAGGAAA GCGAAAGAAG GGAAGGAAAG AGCGGTGCAA
3401 CGCCGGCTTT CCCCCTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC
GCGGCCGAAA GGGGCAGTTC GAGATTTAGC CCCCAGGGA AATCCCAAGG
3451 GATTTAGTGC TTTACGGCAC CTCGACCCCA AAAA ACTTGA TTTGGGTGAT
CTAAATCACG AAATGCCGTG GAGCTGGGGT TTTTGA ACT AAACCCACTA
3501 GGTTCACGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC GTCCTTTGAC
CCAAGTGCAT CACCCGGTAG CGGGACTATC TGCCAAAAAG CAGGAAACTG
3551 GTTCGAGTCC ACGTTCTTTA ATAGTGGACT CTTGTTCCAA ACTGGAACAA
CAAGCTCAGG TGCAAGAAAT TATCACCTGA GAACAAGGTT TGACCTTGTT
3601 TACTCAACCC TATCTCGGGC TATCTTTTGT ATTTATAAGG GATTTTGCCG
ATGAGTTGGG ATAGAGCCCG ATAAGAAAAC TAAATATTCC CTA AACCGGC
3651 ATTTGGCCCT ATTGGTTAAA AAATGAGCTG ATTTAACAAA AATTTAACGC
TAAAGCCGGA TAACCAATTT TTTACTCGAC TAAATTGTTT TTA AATTGCG
3701 GAATTTTAAC AAAATATTAA CGTTTACAA TTTATGGTGC AGTCTCAGTA
CTTAAAATTG TTTTATAATT GCAAATGTTA AAATACCAG TCAGAGTCAT
3751 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCCGCCAACA
GTTAGACGAG ACTACGGCGT ATCAATTCGG TCGGGGCTGT GGGCGGTTGT
3801 CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG CTCCCGGCAT CCGCTTACAG
GGGCGACTGC GCGGGACTGC CCGAACAGAC GAGGGCCGTA GGCGAATGTC
3851 ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG TTTTCACCGT
TGTTCGACAC TGGCAGAGGC CCTCGACGTA CACAGTCTCC AAAAGTGGCA
3901 CATCACCAG AC GCGCGA
GTAGTGGCTT TGCGCGCT

```

Fig. 13



Secuencia de nucleótidos de pXP14

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA
   CTGCTTTCCC GGAGCACTAT GCGGATAAAA ATATCCAATT ACAGTACTAT
51  ATAATGGTTT CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG
   TATTACCAA GAATCTGCAG TCCACCGTGA AAAGCCCTTT TACACGCGCC
101 AACCCCTATT TGTTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA
   TTGGGGATAA ACAAATAAAA AGATTTATGT AAGTTTATAC ATAGGCGAGT
151 TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA AAGGAAGAGT
   ACTCTGTTAT TGGGACTATT TACGAAGTTA TTATAACTTT TTCTTCTCA
201 ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT TTGCGGCATT
   TACTCATAAG TTGTAAAGGC ACAGCGGGAA TAAGGGAAAA AACGCCGTAA
251 TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
   AACGGAAGGA CAAAAACGAG TGGGTCTTTG CGACCACTTT CATTTCTAC
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCT CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC
   GACTTCTAGT CAACCCACGA GCTCACCCAA TGTAGCTTGA CCTAGAGTTG
351 AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT
   TCGCCATTCT AGGAACTCTC AAAAGCGGGG CTTCTTGCAA AAGGTTACTA
401 GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATPGACG
   CTCGTGAAAA TTTCAAGACG ATACACCGCG CCATAATAGG GCATAACTGC
451 CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
   GGCCCGTTCT CGTTGAGCCA GCGGCGTATG TGATAAGAGT CTTACTGAAC
501 GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT
   CAACTCATGA GTGGTCAGTG TCTTTTCGTA GAATGCCTAC CGTACTGTCA
551 AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
   TTCTCTTAAT ACGTCACGAC GGTATTGGTA CTCACTATTG TGACGCCGGT
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTTG
   TGAATGAAGA CTGTTGCTAG CCTCCTGGCT TCCTCGATTG GCGAAAAAAC
651 CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT
   GTGTTGTACC CCCTAGTACA TTGAGCGGAA CTAGCAACCC TTGGCCTCGA
701 GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA
   CTTACTTCGG TATGGTTTGC TGCTCGCACT GTGGTGCTAC GGACATCGTT
751 TGGCAACAAC GTTGCGCAA CTATTAAGT GCGAACTACT TACTCTAGCT
   ACCGTTGTTG CAACGCGTTT GATAATTGAC CGCTTGATGA ATGACTCGA
801 TCCCAGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG TTGCAGGACC
   AGGGCCGTTG TTAATTATCT GACCTACCTC CGCCTATTTT AACGTCCTGG
851 ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
   TGAAGACGCG AGCCGGGAAG GCCGACCGAC CAAATAACGA CTATTTAGAC
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT
   CTCGGCCACT CGCACCCAGA GCGCCATAGT AACGTCGTGA CCCCGGTCTA
951 GGTAAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC
   CCATTGCGGA GGGCATAGCA TCAATAGATG TGCTGCCCTT CAGTCCGTTG
1001 TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA
   ATACCTACTT GCTTTATCTG TCTAGCGACT CTATCCACGG AGTGACTAAT
1051 AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT CATATATACT TTAGATTGAT
   TCGTAACCAT TGACAGTCTG GTTCAAATGA GTATATATGA AATCTAACTA
1101 TTAATACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA TCCTTTTTGA
   AATTTTGAAG TAAAAATTAA ATTTTCCTAG ATCCACTTCT AGGAAAAACT
1151 TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
   ATTAGAGTAC TGGTTTTAGG GAATTGCACT CAAAAGCAAG GTGACTCGCA
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG
   GTCTGGGGCA TCTTTTCTAG TTTCCTAGAA GAACTCTAGG AAAAAAAGAC

```

1251 CGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT
GCGCATTAGA CGACGAACGT TTGTTTTTTT GGTGGCGATG GTCGCCACCA
1301 TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAAGTGGCT
AACAAACGGC CTAGTTCTCG ATGGTTGAGA AAAAGGCTTC CATTGACCGA
1351 TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA
AGTCGTCTCG CGTCTATGGT TTATGACAGG AAGATCACAT CGGCATCAAT
1401 GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC TCGCTCTGCT
CCGGTGGTGA AGTTCTTGAG ACATCGTGGC GGATGTATGG AGCGAGACGA
1451 AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
TTAGGACAAT GGTCAACGAC GACGGTCACC GCTATTCAGC ACAGAATGGC
1501 GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA
CCAACCTGAG TTCTGTATC AATGGCCTAT TCCGCGTCGC CAGCCCGACT
1551 ACGGGGGGTT CGTGCATACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA
TGCCCCCAA GCACGTATGT CGGGTCGAAC CTCGCTTGCT GGATGTGGCT
1601 ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG
TGACTCTATG GATGTCCGAC TCGATACTCT TTCGCGGTGC GAAGGGCTTC
1651 GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG AACAGGAGAG
CCTCTTFCG CCTGTCCATA GGCCATTCGC CGTCCCAGCC TTGTCCCTCTC
1701 CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT ATAGTCCTGT
GCGTGCTCCC TCGAAGGTCC CCCTTTGCGG ACCATAGAAA TATCAGGACA
1751 CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTTGTGA TGCTCGTCAG
GCCCCAAGCG GTGGAGACTG AACTCGCAGC TAAAAACACT ACGAGCAGTC
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGCCCTT TTTACGGTTC
CCCCCGCCTC GGATACCTTT TTGCGGTCTG TCGCCCGGAA AAATGCCAAG
1851 CTGGCCTTTT GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCTCG CGTTATCCCC
GACCGGAAAA CGACCGGAAA ACGAGTGTAC AAGAAAGGAC GCAATAGGGG
1901 TGATFCTGTG GATAACCGTA TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC
ACTAAGACAC CTATTGGCAT AATGGCGGAA ACTCACTCGA CTATGGCGAG
1951 GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA
CGGCGTCGGC TTGCTGGCTC GCGTCGCTCA GTCACTCGCT CCTTCGCTT
2001 GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTCGG CGATTCAFTA
CTCGCGGGTT ATGCGTTTGG CGGAGAGGGG CGCGCAACCG GCTAAGTAAT
2051 ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCAGCTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
TACGTCGACC GTGCTGTCCA AAGGGCTGAC CTTTCGCCC GTCCTCGCGT
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC
TGCGTTAATT AACTCAATC GAGTGAGTAA TCCGTGGGGT CCGAAATGTG
2151 TTTATGCTTC CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT
AAATACGAAG GCCGAGCATA CAACACACCT TAACACTCGC CTATTGTAA
2201 TCACACAGGA AACAGCTATG ACCATGATTA CGCCAAGCTT GCATGCAAA
AGTGTGTCTT TTGTCGATAC TGGTACTAAT GCGGTCGAA CGTACGTTA
2251 TCTATTTCAA GGAGACAGTC ATAATGAAAT ACCTATTCGC TACGGCAGCC
AGATAAAGTT CCTCTGTCAG TATTACTTTA TGGATAACGG ATGCCGTGCG
2301 GCTGGATTGT TATTACTCGC GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT
CGACCTAACA ATAATGAGCG CCGGGTCGGC CGGTACCGGG TCCACGTCGA
2351 GCAGGTCGGC CTCGAGATCA AACGGGCGGC CGCAGGTGCG CCGGTGCCGT
CGTCCAGCCG GAGCTCTAGT TTGCCCGCCG GCGTCCACGC GGCCACGGCA
2401 ATCCAGATCC GCTGGAACCG CGTGGGGCCG CAAGCGCTTG GAGCCACCCG
TAGGCTTAGG CGACCTTGGC GCACCCCGGC GTTCGCGAAC CTCGGTGGGC
2451 CAGTTCGAAA AATAATAAGG ATCCGAATTC ACTGGCCGTC GTTTTACAAC
GTCAAGCTTT TTATTATTCC TAGGCTTAAG TGACCGGCAG CAAATGTTG

```

2501  GTCGTGACTG  GGAAAACCCT  GGC GTTACCC  AACTTAATCG  CCTTGCAGCA
      CAGCACTGAC  CCTTTTGGGA  CCGCAATGGG  TTGAATTAGC  GGAACGTCGT
2551  CATCCCCCTT  TCGCCAGCTG  GCGTAATAGC  GAAGAGGCC  GCACCGATCG
      GTAGGGGGAA  AGCGGTCGAC  CGCATTATCG  CTTCTCCGGG  CGTGGCTAGC
2601  CCCTTCCCAA  CAGTTGCGCA  GCCTGAATGG  CGAATGGCGC  CTGATGCGGT
      GGGAAAGGGT  GTCAACGCGT  CGGACTTACC  GCTTACCGCG  GACTACGCCA
2651  ATTTTCTCCT  TACGCATCTG  TGC GG TATTT  CACACCGCAT  ACGTCAAAGC
      TAAAAGAGGA  ATGCGTAGAC  ACGCCATAAA  GTGTGGCGTA  TGCAGTTTCG
2701  AACCATAGTA  CGCGCCCTGT  AGCGGCGCAT  TAAGCCCGGC  GGGTGTGGTG
      TTGGTATCAT  GCGCGGGACA  TCGCCGCGTA  ATTCCGGCCG  CCCACACCAC
2751  GTTACGCGCA  GCGTGACC GC  TACTTGGC  AGCGCCCTAG  CCCCCGCTCC
      CAATGCGCGT  CGCACTGGCG  ATGTGAACGG  TCGCGGGATC  GGGGGCGAGG
2801  TTTGCTTTC  TTCCCTTCCT  TTCTCGCCAC  GTTCGCCGGC  TTTCCCCGTC
      AAAGCGAAAG  AAGGGAAGGA  AAGAGCGGTG  CAAGCGGCCG  AAAGGGGCAG
2851  AAGCTCTAAA  TCGGGGGCTC  CCTTTAGGGT  TCCGATTTAG  TGCTTTACGG
      TTCGAGATTT  AGCCCCGAG  GGAAATCCCA  AGGCTAAATC  ACGAAATGCC
2901  CACCTCGACC  CAAAAAACT  TGATTTGGGT  GATGGTTCAC  GTAGTGGGCC
      GTGGAGCTGG  GGT TTTTGA  ACTAAACCCA  CTACCAAGTG  CATCACCCGG
2951  ATCGCCCTGA  TAGACGGTTT  TTCGTCTTTT  GACGTTCGAG  TCCACGTTCT
      TAGCGGGACT  ATCTGCCAAA  AAGCAGGAAA  CTGCAAGCTC  AGGTGCAAGA
3001  TTAATAGTGG  ACTCTGTTC  CAAACTGGAA  CAATACTCAA  CCTATCTCG
      AATTATCACC  TGAGAACAAG  GTTTGACCTT  GTTATGAGTT  GGGATAGAGC
3051  GGCTATTCTT  TTGATTTATA  AGGGATTTTG  CCGATTTCGG  CCTATTGGTT
      CCGATAAGAA  AACTAAATAT  TCCCTAAAAC  GGCTAAAGCC  GGATAACCAA
3101  AAAAAATGAG  CTGATTTAAC  AAAAAATTTAA  CGCGAATTTT  AACAAAATAT
      TTTTTTACTC  GACTAAATG  TTTTTAATT  GCGCTTAAAA  TTGTTTTATA
3151  TAACGTTTAC  AATTTTATGG  TGCAGTCTCA  GTACAATCTG  CTCTGATGCC
      ATTGCAAATG  TTAATAATACC  ACGTCAGAGT  CATGTTAGAC  GAGACTACGG
3201  GCATAGTTAA  GCCAGCCCCG  ACACCCGCCA  ACACCCGCTG  ACGCGCCCTG
      CGTATCAATT  CGGTCGGGGC  TGTGGGCGGT  TGTGGGCGAC  TCGCGGGGAC
3251  ACGGGCTTGT  CTGCTCCCGG  CATCCGCTTA  CAGACAAGCT  GTGACCGTCT
      TGCCCGAACA  GACGAGGGCC  GTAGGCGAAT  GTCTGTTTCA  CACTGGCAGA
3301  CCGGGAGCTG  CATGTGTCAG  AGGTTTTCAC  CGTCATCACC  GAAACGCGCG
      GGCCCTCGAC  GTACACAGTC  TCCAAAAGTG  GCAGTAGTGG  CTTTGC GCGC
3351  A
      T

```

Fig. 14

cebadores de ADNc

VLK-c	CTGGATGGTGGGAAGATGGA
VLL-c	TCAGAGGAAGGAAACAGGGT
IgG1-c	CTTACAACCACAATCCCTGGGCACAATTTT
IgG2a-c	CTTTGTGGGCCCTCTGGGCTCAAT
IgG2-b	TGAAATGGGCCCGCTGGGCTCAAG
IgG3-c	GGGCTTGGGTATTCTAGGCTCGAT

cebadores directos VH sin sitios de restricción

M-VH1	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGG
M-VH2	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGG
M-VH3	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGG
M-VH4	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGG
M-VH5	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGG
M-VH6	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGG
M-VH7	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGG
M-VH8	GAGGTGAAGCTGGTGGAACTCTGG
M-VH9	GAGGTTTCAGCTTCAGCAGTCTGG

cebadores inversos VH sin sitios de restricción

M-JH1	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC
M-JH2	TGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC
M-JH3	TGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC
M-JH4	TGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC

cebadores directos VL sin sitios de restricción

M-VK1	GACATTGTGATGACACAGTCTCC
M-VK2	GATGTTGTGATGACCCAAACTCC
M-VK3	GATATCCAGATGACACAGACTCC
M-VK4	CAAATTGTTCTCACCAGTCTCC
M-VL1	CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATC

cebadores inversos VL sin sitios de restricción

M-JK1	TTTGATTTCCAGCTTGGTGCCTCC
M-JK2	TTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCCC
M-JK3	TTTCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGC
M-JL1	ACCTAGGACAGTGACCTTGGTTCC

cebadores directos VH con sitios de restricción

MVH1 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGG
MVH2 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGG
MVH3 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGG
MVH4 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGG
MVH5 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGG
MVH6 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGG
MVH7 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGG
MVH8 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGCTGGTGGAAATCTGG
MVH9 Sfil	GTCTCTGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTTCAGCTTCAGCAGTCTGG

cebadores inversos VH con sitios de restricción

MJH1 Sall	GAGTCATTCTCGTGTGACACGGTGACCGTGGTCCC
MJH2 Sall	GAGTCATTCTCGTGTGACACTGTGAGAGTGGTGCC
MJH3 Sall	GAGTCATTCTCGTGTGACACAGTGACCAGAGTCCC
MJH4 Sall	GAGTCATTCTCGTGTGACACGGTGACTGAGGTTC

cebadores directos VL con sitios de restricción

MVK1 ApaL1	TGAGCACACAGTGCCTCGACATTTGATGACACAGTCTCC
MVK2 ApaL1	TGAGCACACAGTGCCTCGATGTTGATGACCCAACTCC
MVK3 ApaL1	TGAGCACACAGTGCCTCGATATCCAGATGACACAGACTCC
MVK4 ApaL1	TGAGCACACAGTGCCTCCAAATTTGTTCTCACCAGTCTCC
MVL1 ApaL1	TGAGCACACAGTGCCTCCAGGCTGTTGATGACTCAGGAATC

cebadores inversos VL con sitios de restricción

M-JK1 Not1	GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTGATTTCCAGCTTGGTGCCTCC
M-JK2 Not1	GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCC
M-JK3 Not1	GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTTCCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGC
M-JL1 Not1	GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGACCTAGGACAGTGACCTTGGTTCC

Fig. 15

Polipéptido	Identificador de sec. nº	Secuencia de la proteína
scFv1	1	<p>1 QVQLKESGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DYMHVVKQR TEQGLEWIGR</p> <p>51 IDPEDGETKY APKFGKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCARSY</p> <p>101 DYAMDYWGOG TTVTVSTGG GSGGGSGGG GSALQIVLTQ SPALMSASPG</p> <p>151 EKVTMTCSAS SSVSYMHWYQ QKSGTSPKRW IYDTSKLAG VPARFSGSGS</p> <p>201 GTSYSLTISS MEAEDAATYY CQQMSSNPLT FGAGTKLELK AAAGAPVPP</p> <p>251 DPLEPRGAAS AWSHPQFEK*</p>
ADN de scFv1	2	<p>1 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGGCAGAGCTGTGAAGCCAGGGCCCTCAGTCRAAGTTGCTTCACACAG</p> <p>71 CTTCTGGCTTCAACANTTAAGACTACTATATGCACTGGGTGAGCAGAGGACTGAACAGGGCCCTGGAGTG</p> <p>141 GATTGGAAAGGATTGATCCTGAGGATGGTGAACATAAATATGCCCGGAATTCACAGGGCAAGGCCACTATA</p> <p>211 ACAGCAGACACATCCTCCACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCGAGGACACATGCCGGTCT</p> <p>281 ATTACTGTGCTAGATCCTACGACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACACCGGTCAACCGGTCTGCAC</p> <p>351 AGGTGGAGGGGTTCCAGGGGAGTGGCTCTGGGGTGGGGAGTGCATCCCAATTTGTTCTCACCCAG</p> <p>421 TCTCCAGCACTCATGTCTGCATCTCCAGGGAGAGTCCACCATGACCTGCGTGGCCAGCTCAAGTGTAA</p> <p>491 GTTACATGCACCTGGTCCAGCAGAAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACT</p> <p>561 GGCCTCTGGAGTCCCTGCTCGCTCAGTGGCAGTGGTCTGGACCTCTTACTCTCACAATCAGCAGC</p> <p>631 ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTCCGGTCTG</p> <p>701 GGACCAAGCTGGAGCTGAAGCGGCCCGCAGGTGCCGGTATCCAGATCCGCTGGACCCGGGTGG</p> <p>771 GGCCCGCAAGCGCTTGGAGCCACCCCGCAGTTCGAAAAATAA</p>

Fig. 16

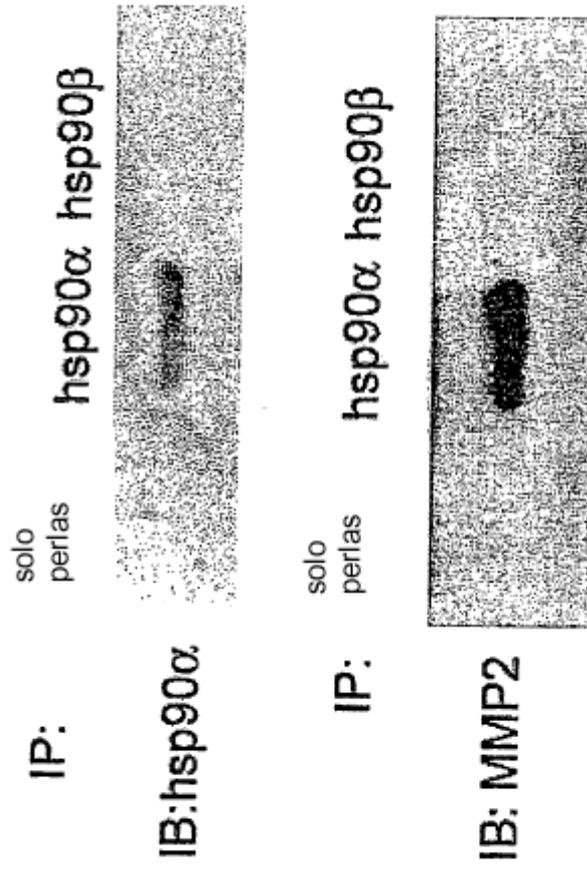


Fig. 17

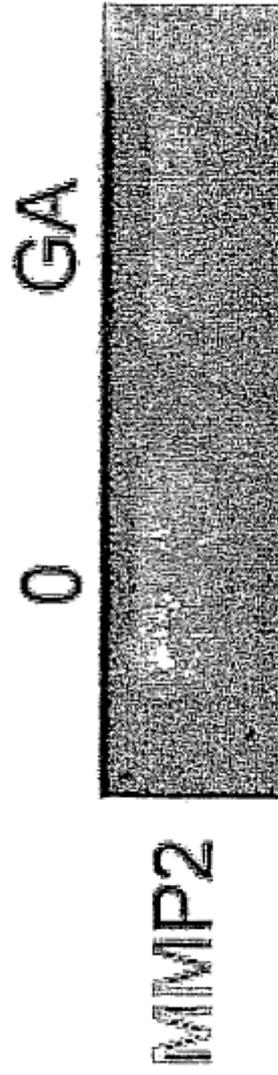


Fig. 18

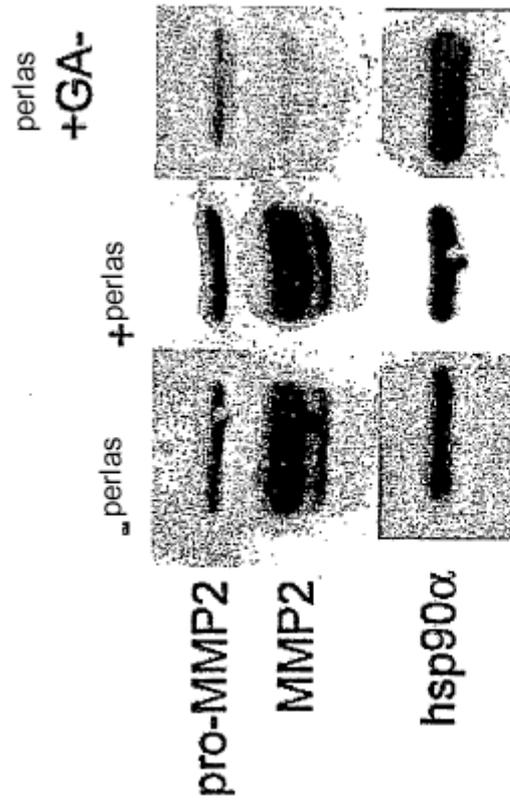


Fig. 19

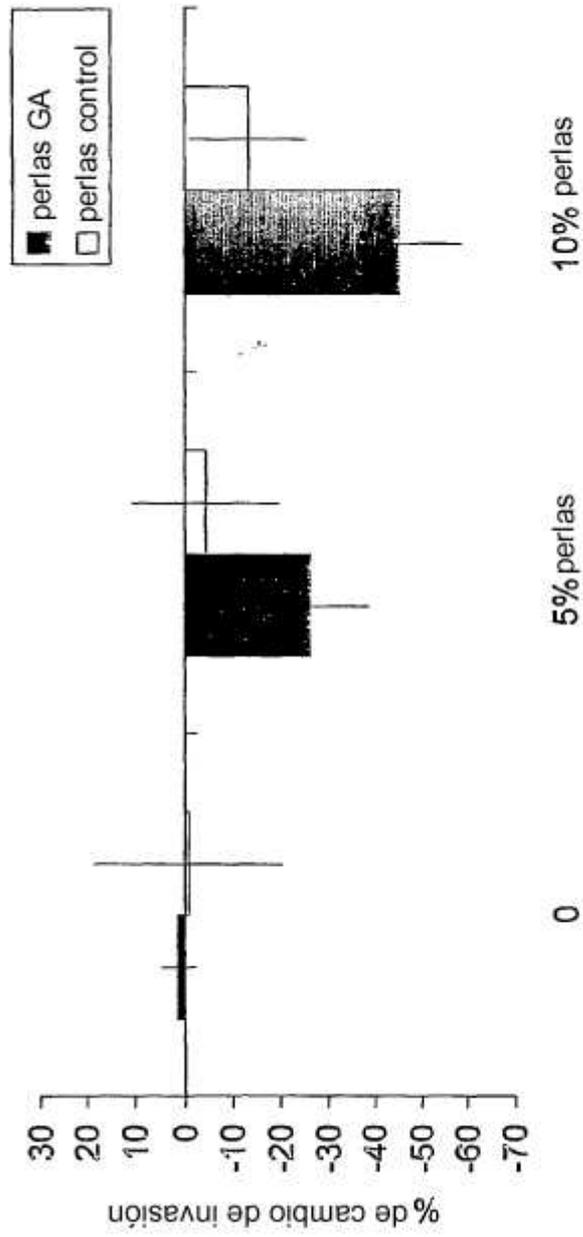


Fig. 20