

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 521**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2013 PCT/GB2013/052765**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO2014064442**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2013 E 13785585 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2912456**

54 Título: **Ensayo para la evaluación del transporte endosomal**

30 Prioridad:

**23.10.2012 GB 201219024**

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

**21.06.2017**

73 Titular/es:

**IPSEN BIOINNOVATION LIMITED (100.0%)  
Units 4-10 The Quadrant Barton Lane  
Abingdon, Oxfordshire OX14 3YS, GB**

72 Inventor/es:

**HARPER, ELAINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 618 521 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

Ensayo para la evaluación del transporte endosomal

La presente invención se refiere a un ensayo y al correspondiente kit para determinar la eficacia de suministro de una molécula en una célula eucariota.

5 Un requisito clave para la eficacia de cualquier molécula terapéutica potencial es que ha de poder demostrar una buena potencia. La presente invención se refiere a moléculas que logran la entrada en el citosol de células eucariotas a través del proceso bien conocido de la endocitosis. Teniendo esto en cuenta, es importante entender las etapas implicadas en el modo de entrada en la célula. Así pues, para ayudar a ilustrar los pasos clave asociados con este modo de entrada en la célula, se hace referencia a la Figura 1. En la etapa 1, la molécula se une a un sitio de unión (por ejemplo un receptor o aceptor) presente en la superficie de la célula. En la etapa 2, el receptor (más la molécula unida) se internaliza en la célula - esta etapa se denomina generalmente "endocitosis" o "formación de endosomas". En la etapa 3, después de la internalización, la molécula se introduce en la membrana endosomal y efectúa la liberación de la molécula (o de una parte de la misma) desde dentro del endosoma, a través de la membrana endosomal y en el citosol de la célula eucariota. Una vez en el citosol (etapa 4), la molécula puede actuar sobre su diana intracelular (por ejemplo, la inhibición de una molécula diana, tal como la segmentación proteolítica de una proteína diana celular).

Así pues, las pruebas de buena potencia se basan en una determinación precisa de una o más de las etapas identificadas anteriormente.

20 Hasta ahora, la prueba de potencia de moléculas capaces de entrar en una célula eucariótica a través de la "endocitosis mediada por receptores" se ha enfocado en moléculas de toxina tales como neurotoxinas clostridiales. A título de ejemplo se han empleado los siguientes ensayos para neurotoxinas clostridiales disponibles comercialmente (por ejemplo, neurotoxina botulínica, que se comercializa bajo nombres tales como Dysport™, Neurobioc™ y Botox™).

25 El ensayo de LD<sub>50</sub> en ratones es actualmente el único ensayo aprobado por la FDA para la liberación de toxinas botulínicas. El ensayo prueba simultáneamente la acción de los tres dominios de una neurotoxina botulínica (es decir, unión, translocación y proteasa). Con más detalle, define la dosis letal intraperitoneal mediana de la toxina en un instante definido usualmente 2 - 4 días después de la administración (la actividad se expresa en unidades de LD<sub>50</sub> en el ratón). Lamentablemente, sin embargo, los ensayos de LD<sub>50</sub> utilizan un gran número de animales. Además, las unidades de LD<sub>50</sub> no son medidas absolutas ya que no son constantes biológicas - como tales son altamente dependientes de las condiciones de ensayo. En particular, los errores asociados con este ensayo pueden ser tan elevados como un 60% entre diferentes laboratorios de ensayo (Sesardic et al., 2003, Biologicals 31 (4): 265 - 276).

35 El ensayo de parálisis flácida del ratón, que también se conoce como "ensayo de ptosis abdominal del ratón", relaciona la actividad de la toxina botulínica con el grado de hinchazón abdominal observado después de que la toxina se ha inyectado por vía subcutánea en la región inguinocrural izquierda de un ratón - la magnitud de la parálisis es dependiente de la dosis. Este planteamiento se ha propuesto como un refinamiento del ensayo de LD<sub>50</sub> de ratón, ya que se basa en un punto final humano. Este ensayo es aproximadamente 10 veces más sensible que el ensayo de LD<sub>50</sub>, usa una dosis sub-letal de toxina y es más rápido que el ensayo de LD<sub>50</sub> ya que proporciona resultados en un tiempo de 24 a 48 horas, en comparación con 72 a 96 horas para un ensayo de LD<sub>50</sub> típico. Los resultados de este ensayo muestran una excelente concordancia con los valores de LD<sub>50</sub> (Sesardic et al., 1996). Aunque este ensayo utiliza el 20% de los animales utilizados en el ensayo de LD<sub>50</sub>, todavía necesita el uso de animales.

45 Los ensayos tales como el ensayo de hemi-diafragma del nervio frénico de ratón/rata (que se basan en el uso de preparados de músculo nervioso *ex vivo*) relacionan la actividad de la neurotoxina botulínica con una disminución de la amplitud de una respuesta de espasmo del preparado después de ser aplicado a un medio de mantenimiento. El punto final habitual del ensayo es el tiempo requerido antes de que se observe una disminución del 50% en la amplitud. Lamentablemente, sin embargo, el ensayo de hemi-diafragma (como el ensayo de LD<sub>50</sub>) da como resultado el uso de un gran número de animales. Además, el ensayo requiere personal altamente cualificado adiestrado en el uso de un equipo sofisticado y caro.

50 Los ensayos de segmentación de sustrato utilizando neuronas de médula espinal cultivadas relacionan la actividad de la neurotoxina botulínica con la segmentación de una proteína específica presente en dichas neuronas. Aunque el ensayo utiliza menos animales que los ensayos *in vivo* (LD<sub>50</sub>, ensayo de parálisis flácida del ratón) y *ex vivo* (hemi-diafragma), el ensayo requiere personal altamente cualificado para realizar la disección y los cultivos - las técnicas de disección y cultivo requieren tiempo y deben ser planificadas ~ 3 semanas antes de ser requeridas. Otro inconveniente es que las medidas de segmentación del sustrato pueden ser altamente variables.

Todos los ensayos anteriores tienen fallos particulares, en especial cuestiones de bienestar animal y/o limitación a la prueba de moléculas que se unen a la unión neuromuscular (NMJ) - siendo estas últimas las células diana a las que se une una neurotoxina clostridial natural.

El documento WO95/33850 describe un ensayo de segmentación de sustrato libre de células en el que el producto segmentado es detectado por un anticuerpo específico del epitopo. Dado que el anticuerpo es capaz de distinguir el sustrato segmentado de la proteína sustrato no segmentada, es posible cuantificar la potencia de una neurotoxina clostridial. Aunque este ensayo no adolece del bienestar animal anteriormente identificado o de los déficits específicos de la NMJ, es en realidad un ensayo "libre de células" y, como tal, solamente es capaz de evaluar la potencia en el mero contexto de la segmentación de proteínas. En consecuencia, el documento WO95/33850 no puede evaluar la potencia en el contexto de una o más de las etapas igualmente importantes, en particular: unión con células; formación de endosomas; o translocación a través de la membrana endosomal. Dicho de otra manera, una molécula identificada (de acuerdo con el documento WO95/33850) como una molécula de segmentación del sustrato eficaz puede tener poca o ninguna potencia terapéutica útil - por ejemplo, porque carece de una o más de: unión celular óptima; formación de endosomas óptima; y/o función de translocación óptima.

Sun et al. (Biochemistry 2012, 51: 5655 - 5662) intenta describir un estudio de las tasas de translocación de dos neurotoxinas botulínicas.

Así pues, en la técnica existe por tanto la necesidad de un ensayo de potencia alternativo y/o mejorado, que se dirige a uno o más de los problemas identificados anteriormente. Por ejemplo, existe la necesidad de un ensayo humano que aborde problemas existentes de bienestar animal. Del mismo modo, existe la necesidad de un ensayo que no se limite a probar moléculas que se unen específicamente a la NMJ y/o a las células neuronales. De forma similar, existe la necesidad de un ensayo que proporcione resultados de potencia fiables para moléculas, en particular de un ensayo que proporcione resultados de potencia que sean reflejo de la potencia *in vivo*.

La presente descripción aborda los problemas identificados anteriormente proporcionando un ensayo que comprende:

i) poner en contacto una célula eucariota con una molécula de ensayo que se ha de evaluar en relación con la capacidad de liberación de endosomas, en donde dicha célula eucariota comprende una membrana celular que incluye un sitio de unión presente en la superficie externa de la membrana celular de dicha célula;

ii) incubar la molécula de ensayo con dicha célula eucariota, y permitir de esta forma:

a) que la molécula de ensayo se una y forme un complejo unido con el sitio de unión presente en la célula eucariota, permitiendo así que dicho complejo unido entre en la célula eucariota mediante endocitosis;

b) que uno o más endosomas se formen dentro de dicha célula, en donde el uno o más endosomas contienen la molécula de ensayo; y

c) que dicha molécula de ensayo entre en el citosol de la célula eucariota cruzando la membrana endosomal del uno o más endosomas;

iii) eliminar el exceso de molécula de ensayo que no está unido a los sitios de unión presentes en las células eucariotas;

iv) después de un período de tiempo predeterminado, detectar la cantidad de molécula de ensayo presente en el uno o más endosomas, o detectar la cantidad de molécula de ensayo presente en el citosol de dicha célula eucariota;

v) comparar la cantidad de molécula de ensayo detectada en la etapa iv) con un valor testigo o de control, en el que dicho valor de control representa la cantidad de molécula de ensayo presente en uno o más endosomas o la cantidad de molécula de ensayo presente en el citosol antes de la etapa iv) ;

vi) calcular un valor de liberación de endosomas para la molécula de ensayo determinando el cambio relativo de la cantidad de molécula de ensayo que está presente dentro del uno o más endosomas o determinando el cambio relativo de la cantidad de molécula de ensayo presente en el citosol de dicha célula eucariota.

La célula eucariota puede elegirse entre una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de vertebrado, una célula de mamífero, una célula vegetal y una célula fúngica. Los ejemplos de tales células animales incluyen células humanas, de roedores, de ratón y de hámster.

En una realización, el sitio de unión con las células eucariotas es capaz de endocitosis mediada por el receptor o bien de endocitosis no mediada por el receptor. El sitio de unión puede ser un receptor o un aceptor. Los ejemplos de secuencias de péptidos que son endocitados a través de sitios de unión no receptor incluyen péptidos que tienen secuencias ricas en arginina (por ejemplo RRRRRRRR, RRRRRRRW) y péptidos tales como PHLIP, Pep-1, SAPE, PFVYLI y AAVALIPAVILALLAP derivado de Kaposi FGF. Se cree que estos péptidos son endocitados en células a través de interacciones iónicas no específicas. El sitio de unión puede ser un sitio de unión que se produce naturalmente en la superficie celular de una célula eucariota. Alternativamente, una célula eucariota puede ser una célula eucariota recombinante que ha sido modificada para expresar un sitio de unión que no se presentaría naturalmente en la superficie celular de dicha célula eucariota.

La etapa de incubación ii) puede proseguir durante un periodo de tiempo determinado, por ejemplo durante un periodo de tiempo de 5 minutos a 5 días. Un período de tiempo típico es de 1 a 12 horas, por ejemplo 2 a 10 horas, de 4 a 8 horas, o de 6 a 8 horas. Durante este período, la célula eucariota (es decir, la superficie externa de la membrana celular) se expone a la molécula de ensayo (típicamente un exceso de molécula de ensayo) con el resultado de que se llega a un “estado estacionario” en el que la molécula de ensayo entra y sale de los endosomas intracelulares aproximadamente a la misma velocidad. Este punto en el tiempo representa un punto de tiempo óptimo en el que llevar a cabo las etapas iii y/o iv).

La etapa iii) implica reducir o eliminar la fuente de molécula de ensayo externa a la célula eucariota, reduciendo así (o evitando sustancialmente) la cantidad de molécula de ensayo que entra en la célula. Dicha reducción en la cantidad de molécula de ensayo que entra en la célula eucariota, a su vez, proporciona un cambio en la cantidad de molécula de ensayo que entra en los endosomas, que a su vez tiene por resultado un cambio en la cantidad (o velocidad) de la molécula de ensayo que sale de los endosomas y/o que entra en el citosol de la célula eucariota. Es la cantidad (o velocidad) de molécula de ensayo que sale de las estructuras endosomales lo que proporciona la base del ensayo de la presente invención - dicha cantidad (o velocidad) de la molécula de ensayo que sale de las estructuras endosomales puede medirse por un cambio en la cantidad de molécula de ensayo presente en los endosomas y/o por un cambio en la cantidad de molécula de ensayo presente en el citosol. Cuando se mide la cantidad de molécula de ensayo presente en los endosomas, típicamente se observa una reducción en la cantidad de molécula de ensayo presente. Cuando se mide la cantidad de molécula de ensayo presente en el citosol, se puede observar un aumento o una disminución en la cantidad de molécula de ensayo presente dentro del citosol. A título de ejemplo, puede observarse un aumento en la cantidad de molécula de ensayo en el citosol cuando se inicia la etapa iii) antes del establecimiento del transporte endosomal en estado estacionario de la molécula de ensayo. Alternativamente, puede observarse una disminución de la cantidad de molécula de ensayo en el citosol cuando la velocidad de secreción celular de la molécula de ensayo desde la célula eucariota sobrepasa la velocidad de transporte endosomal de la molécula de ensayo desde los endosomas al citosol.

Las células eucariotas empleadas en el ensayo pueden ser inmovilizadas sobre una superficie. La inmovilización de las células se puede realizar como una etapa pre-ensayo (es decir, pre-inmovilización), o puede realizarse como parte del protocolo de ensayo. Así pues, en una forma de realización, las células del ensayo son preinmovilizadas. La inmovilización de las células eucariotas puede realizarse por cualquier medio convencional. A título de ejemplo, las células se siembran en las placas de ensayo a densidad alta y se dejan que se adhieran antes de que se realice el ensayo. Alternativamente, las células se siembran en placas de ensayo y se cultivan durante varios días antes de ser usadas para proporcionar una monocapa confluyente. La fijación de las células puede potenciarse usando revestimientos convencionales, tales como placas recubiertas con poli-D-lisina.

En una forma de realización, la inmovilización de las células eucariotas puede realizarse antes o durante la etapa iii), proporcionando de este modo un medio simple para separar dichas células de la molécula de ensayo libre (por ejemplo, no unida o exógena). Alternativamente, la inmovilización puede realizarse después de la etapa iii), por ejemplo para facilitar la etapa de detección iv).

La etapa iii) puede incluir una etapa de filtración o una etapa de ligando de afinidad durante la cual las células eucariotas se separan de la molécula de ensayo en exceso (por ejemplo, no unida o exógena). La etapa iii) puede incluir una etapa de lavado en la que la molécula de ensayo en exceso (por ejemplo, no unida o exógena) se elimina de las células eucariotas mediante lavado, por ejemplo usando un tampón convencional. Se entiende que la molécula de ensayo en exceso significa la molécula de ensayo que está presente en el medio de ensayo, externo a las células eucariotas, y que todavía no ha llegado a unirse a un sitio de unión presente en la superficie de las células eucariotas.

La detección de la molécula de ensayo en la etapa iv) se realiza típicamente poco después de la etapa iii). A título de ejemplo, un intervalo de tiempo típico para la etapa iv) está entre 5 minutos y 5 horas después de la etapa iii). En una forma de realización, la etapa iv) se lleva a cabo de 15 a 240 minutos, o 30 a 180 minutos, o 45 a 150 minutos después de la etapa iii). La etapa de detección iv) puede repetirse a lo largo de varios momentos, por ejemplo a intervalos de 10 minutos o 15 minutos o 30 minutos – esto permitirá calcular una velocidad de liberación endosomal.

La etapa de detección iv) puede llevarse a cabo por cualquier medio convencional. A título de ejemplo, la detección independiente de la permeabilización se puede conseguir monitorizando la propia molécula de ensayo. Esto puede conseguirse marcando la molécula de ensayo con un fluoróforo. Los fluoróforos adecuados que pueden unirse a la molécula de ensayo incluyen fluoresceína, rodamina, proteína fluorescente verde, nanotubos de carbono de pared simple y alexa-fluor®488.

La detección de la molécula de ensayo puede basarse en la localización intracelular de dicha molécula de ensayo - un ejemplo de tal localización dentro del citosol es la localización al núcleo de la célula. En esta realización, la molécula de ensayo está marcada (por ejemplo, con un fluoróforo) y también posee una señal de localización nuclear. Así pues, el marcador puede detectarse en el endosoma y el escape endosomal puede determinarse monitorizando la acumulación de marcador (por ejemplo, fluorescencia) en el núcleo de la célula. En relación con esto, el propio núcleo puede marcarse con un colorante - los colorantes nucleares convencionales son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, la tinción de Hoescht).

Puede ser empleado cualquier medio de detección convencional para monitorizar la molécula de ensayo, tal como la Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET). A título de ejemplo, el par donador/aceptor puede ser proteína fluorescente ciano (CFP) y proteína fluorescente amarilla (YFP). Otros pares donador/aceptor para uso en FRET son bien conocidos en la técnica. En una forma de realización, se puede detectar la molécula de ensayo marcada con CFP y YFP y se puede determinar la cantidad de molécula de ensayo presente en el endosoma y/o el citosol. En una forma de realización, puede ser monitorizada la pérdida de una señal de FRET. Por ejemplo, si sólo una parte de la molécula de ensayo fue trasladada desde el endosoma al citoplasma, esto podría conducir a la pérdida de la señal de FRET si se separa el par donante/aceptor (por ejemplo, CFP y YFP). Así, por ejemplo, la molécula de ensayo puede comprender (o consiste en) la cadena L y el dominio H<sub>N</sub> de una neurotoxina clostridial (o derivados o equivalentes funcionales de la misma, por ejemplo un TSI). Las etiquetas donador/aceptor (por ejemplo, CFP y YFP) se pueden poner en dichos dos componentes, por ejemplo la cadena L puede marcarse con CFP y el componente H<sub>N</sub> puede marcarse con YFP. En una forma de realización, la señal de FRET es detectable mientras la molécula de ensayo que comprende LH<sub>N</sub> está presente en el endosoma celular. La función de translocación del componente H<sub>N</sub> libera entonces el resto terapéutico (es decir, cadena L) en el citosol, y la señal de FRET desaparece a medida que los marcadores CFP y YFP se separan entre sí.

También puede usarse la Transferencia de Energía de Resonancia de Bioluminiscencia (BRET) para monitorizar/detectar la molécula de ensayo. En la BRET, el fluoróforo donante del par FRET es reemplazado por una luciferasa. Las metodologías BRET adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

En una forma de realización, la detección de la molécula de ensayo puede estar basada en la diferencia natural de pH que existe dentro de un endosoma en relación con el pH del citosol. En esta forma de realización, la molécula de ensayo puede ser marcada con un marcador sensible al pH, tal como un colorante sensible al pH. El marcador puede seleccionarse para que sea detectable/visible (por ejemplo, con una intensidad mayor) en un intervalo de pH específico. Así pues, el marcador puede ser elegido para ser detectable/visible (por ejemplo, con mayor intensidad) solamente cuando está presente en el endosoma, e invisible /indetectable (por ejemplo, con menor intensidad) cuando está presente en el citosol. Alternativamente, el marcador puede elegirse para hacerse detectable/visible solamente en la translocación de la molécula de ensayo en el citosol. Los expertos en la técnica conocen marcadores adecuados (por ejemplo, colorantes) tales como indicadores de pH basados en fluoresceína (por ejemplo BCECF, BCPCF) y sus derivados, colorantes de benzoxanteno, colorantes basados en cianina y otros indicadores de pH de molécula pequeña (por ejemplo, complejo de europio, derivados de fluoreno, 1,4-dihidroxi-ftalónitrilo (1,4-DHPN), ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS)), indicadores de pH ácidos tales como una sonda de piridil oxazol Amarillo/Azul DND-160 PDMPO 59, el sensor basado en antraceno DND-167 60, DND-189 61, DND-153 62 y DND 192 63, colorantes basados en BODIPY (por ejemplo BODIPYs 68, NH2BDP 68a, DiMeNBDP 68b, Et-MeNBDP 68c y DiEtNBDP 68d) e indicadores pHrodo.

Dependiendo del tipo de medio de detección empleado, puede ser deseable permeabilizar las células eucariotas diana. A título de ejemplo, se puede unir una etiqueta proteica o no proteica a la molécula de ensayo (tal como una etiqueta myc o biotina) o la propia molécula de ensayo puede incluir inherentemente un componente detectable (tal como un epítopo) y la detección subsiguiente puede conseguirse usando un anticuerpo primario marcado o un anticuerpo primario no marcado junto con un anticuerpo secundario marcado. Los reactivos y metodologías de detección de anticuerpos son bien conocidos y rutinarios para los expertos en la técnica. De forma similar, los compañeros de unión son bien conocidos en la técnica y, por ejemplo, puede usarse estreptavidina marcada para detectar una molécula testigo biotinilada. La permeabilización típica incluye una etapa inicial de fijación (por ejemplo con formaldehído, paraformaldehído, etanol o metanol) seguida por la permeabilización con un agente apropiado – los agentes de permeabilización convencionales son bien conocidos en la técnica (por ejemplo triton X-100, digitonina, tween 20 y/o saponina).

La etapa de comparación v) utiliza un valor de control, que representa la cantidad de molécula de ensayo presente en los endosomas y/o citosol antes de la etapa de detección iv). El valor de control se determina típicamente por los mismos medios/métodos por los cuales se determina la cantidad de molécula de ensayo en la etapa de detección iv). El valor de control representa típicamente la cantidad de molécula de ensayo presente en los endosomas y/o el citosol durante o antes de la etapa iii). A título de ejemplo, el valor testigo puede representar la cantidad de molécula de ensayo presente en los endosomas y/o el citosol durante o al final de la etapa ii) - en una forma de realización, el valor de control representa la cantidad de molécula de ensayo que está presente en los endosomas y/o el citosol cuando se ha establecido una velocidad de translocación en "estado estacionario", es decir, cuando la molécula de ensayo entra y sale de los endosomas intracelulares a aproximadamente la misma velocidad.

La molécula de ensayo puede ser una "molécula pequeña" terapéutica tal como fingolimod, monastrol, pamidronato, metotrexato, buspirona, nemonapride, apipiprazol, bifeprunox, SKF82958, octreotida, MK-5046, FO38-WE-05, rilmenidina, SCH655842, salvinorina, CP55940 o una nanopartícula. Las nanopartículas se han dirigido con éxito y se ha demostrado que se internalizan en las células dirigiéndose a través de un anticuerpo (véase, por ejemplo, Wartlick et al., J. Drug Target, 12: 461 - 471). Así pues, en una forma de realización, la molécula de ensayo puede ser una nanopartícula ligada, entre otras cosas, a un componente de resto de direccionamiento o estructura diana tal como un anticuerpo o un ligando a un receptor presente en las células de ensayo.

Alternativamente, la molécula de ensayo puede ser una molécula más grande tal como un polipéptido o una proteína. Entre los ejemplos particulares se incluyen toxinas, tales como proteínas citotóxicas y proteínas no citotóxicas. En relación con esto, la referencia a polipéptidos y proteínas incluye polipéptidos y proteínas tanto naturales como recombinantes.

5 Las proteínas citotóxicas actúan matando sus células diana naturales. Este grupo de toxinas se ejemplifica entre otras cosas mediante toxinas vegetales tales como ricina y abrina, y mediante toxinas bacterianas tales como toxina diftérica y exotoxina A de *Pseudomonas*. Típicamente las toxinas citotóxicas matan sus células diana inhibiendo el proceso celular de síntesis proteica. Esta clase de proteína incluye proteínas citotóxicas re-dirigidas en las que la capacidad de unión natural de la proteína ha sido modificada por la introducción de un ligando de unión (también conocido como resto de direccionamiento), confiriendo de esta forma nuevas propiedades de unión de la célula diana a la proteína modificada.

En cambio, las proteínas no citotóxicas actúan sobre las células diana incapacitando la función celular. Es importante el hecho de que las toxinas no citotóxicas no matan las células diana sobre las que actúan. Algunos de los ejemplos mejor conocidos de proteasas no citotóxicas incluyen neurotoxinas clostridiales (por ejemplo, neurotoxina botulínica, que se comercializa bajo nombres tales como Dysport™, Neurobotoc™ y Botox™, proteasas IgA (véase, por ejemplo, el documento WO99/032272) y proteasas antareasa (véase, por ejemplo, el documento WO2011/022357). Las proteasas no citotóxicas actúan segmentando proteolíticamente y por tanto inactivando las proteínas de transporte intracelulares conocidas como proteínas SNARE (por ejemplo SNAP-25, VAMP o Syntaxin) - véase Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4ª edición) John Wiley & Sons, Inc. El acrónimo SNARE deriva de la expresión "Soluble NSF Attachment Receptor, en la que NSF significa N-ethylmaleimide-Sensitive Factor (factor sensible a la N-etilmaleimida). Las proteínas SNARE son componentes esenciales del proceso de secreción vesicular en las células eucariotas. Así pues, las proteasas no citotóxicas actúan suprimiendo la secreción celular. Esta clase de proteína incluye proteínas no citotóxicas re-dirigidas en las que la capacidad de unión natural de la proteína ha sido modificada mediante la introducción de un ligando de unión (también conocido como resto de direccionamiento o estructura diana), confiriendo así nuevas propiedades de unión de células diana en la proteína modificada. El presente solicitante ha sido pionero en la tecnología relacionada con el re-direccionamiento de proteasas no citotóxicas, que se remonta a los años noventa (véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/21300, WO 96/33273 y WO 98/07864). Dichas proteínas re-dirigidas se citan, en la bibliografía y en la comunidad científica, como inhibidores de secreción dirigidos (TSIs: Targeted Secretion Inhibitors) - la referencia a TSIs incluye equivalentes estructurales tales como los descritos en el documento WO 2011/018665.

El aspecto de ensayo de la "molécula de ensayo" de la presente invención puede incluir además una etapa de detección de la actividad *in situ* de la molécula de ensayo. Por ejemplo, en el contexto de una neurotoxina clostridial o un TSI, el ensayo puede comprender además una etapa de detección de la segmentación de las proteínas SNARE. Puede ser empleado cualquier medio de detección tal como, por ejemplo, el método descrito en el documento WO95/33850 o mediante el ensayo FRET.

El ensayo de la presente invención se puede emplear por separado para evaluar los efectos inhibidores de una molécula de bloqueo sobre el sistema de transporte endosomal de una célula eucariota. Así, en un aspecto relacionado, la presente descripción proporciona un ensayo que comprende:

40 i) poner en contacto una célula eucariota con una molécula testigo que se une a un sitio de unión presente en la superficie de dicha célula eucariota, en donde dicha molécula testigo forma un complejo unido con el sitio de unión, se introduce en la célula eucariota por endocitosis durante la cual se forma un endosoma que contiene la molécula testigo, y en donde dicha molécula testigo entra en el citosol de la célula eucariota cruzando la membrana endosomal del endosoma;

ii) incubar la molécula testigo con dicha célula eucariota, y permitir así

45 a. que la molécula testigo se una y forme un complejo unido con el sitio de unión presente en la célula eucariota, permitiendo de este modo que dicho complejo unido entre en la célula eucariota por endocitosis;

b. que uno o más endosomas se formen dentro de dicha célula, con lo que el uno o más endosomas contienen la molécula testigo; y

50 c. que dicha molécula testigo entre en el citosol de la célula eucariota cruzando la membrana endosomal del uno o más endosomas;

iii) poner en contacto la célula eucariota con una molécula inhibidora de ensayo que se va a evaluar en cuanto a su capacidad para suprimir la liberación endosomal de molécula testigo a partir de uno o más endosomas. Dicho contacto de la célula eucariota con la molécula inhibidora de ensayo puede realizarse antes, durante o después de la etapa i) y/o durante o después de la etapa ii);

55 iv) después de un periodo de tiempo predeterminado, detectar la cantidad de molécula testigo presente en el uno o más endosomas, o detectar la cantidad de molécula testigo presente en el citosol de dicha célula eucariota;

v) comparar la cantidad de molécula testigo detectada la etapa iv) con un valor de control, en el que dicho valor de control representa la cantidad de molécula testigo presente en el uno o más endosomas o la cantidad de molécula testigo presente en el citosol antes de la etapa iii);

- 5 vi) asignar un valor de inhibición para la molécula inhibidora de ensayo determinando el cambio relativo en la cantidad de molécula testigo que está presente dentro del uno o más endosomas, o determinando el cambio relativo en la cantidad de molécula testigo presente en el citosol de dicha célula eucariota.

10 La molécula testigo puede ser una "molécula pequeña" terapéutica como se ha mencionado anteriormente, tal como un inhibidor de PMSA (véase Liu et al., 2008) o fingolimod, monastrol, pamidronato, metotrexato, buspirona, nemonapride, apipiprazol, bifeprunox, SKF82958, octreotida, MK-5046, FO38-WE-05, rilmenidina, SCH655842, salvinorina, CP55940 o una nanopartícula.

15 Alternativamente, la molécula testigo puede ser una molécula más grande tal como un polipéptido o una proteína. Entre los ejemplos particulares se incluyen toxinas, tales como proteínas citotóxicas y proteínas no citotóxicas. En relación con esto, la referencia a polipéptidos y proteínas incluye polipéptidos y proteínas tanto naturales como recombinantes. Ejemplos de proteínas citotóxicas y no citotóxicas adecuadas se han descrito anteriormente en este documento. En relación con proteínas no citotóxicas, los ejemplos preferidos incluyen neurotoxinas clostridiales (tales como toxina tetánica, BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C<sub>1</sub>, BoNT /D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G o *C. butyricum*, incluyendo sus versiones naturales y modificadas, así como combinaciones de los mismos), TSIs (tales como los descritos anteriormente en la presente memoria), proteasas antareasa y proteasas IgA.

20 Los ejemplos de moléculas inhibidoras de ensayo incluyen bloqueadores de poros tales como toosendanina - véase Fischer, A. et al. (2009) PNAS, vol. 106, N° 5, páginas 1330 - 1335; bloqueadores de protones-ATPasa tales como bafilomicina A - véase Bartz et al. (2011) Biochem J 435 págs. 475-487, concanamycin A (Tscherne y otros (2006) J. Virol, Vol. 80, N° 4, pp. 1234 - 1741 y prodigiosinas - véase Ohkuma et al. (1998) J. Biochem. Vol. 334, pp 731 - 741.

25 Todas las etapas descritas anteriormente con referencia al ensayo básico de la presente invención son válidas igualmente para al ensayo de molécula inhibidora de ensayo descrito anteriormente.

30 La etapa de contacto iii) en el ensayo de molécula inhibidora de ensayo descrito anteriormente puede tener lugar durante cualquier período de tiempo dado, por ejemplo durante un período de tiempo de 5 minutos a 5 días antes del inicio de la etapa de incubación ii), tal como entre 30 minutos y 12 horas o entre 30 minutos y 10 horas o entre 30 minutos y 8 horas o entre 1 y 8 horas después del inicio de la etapa de incubación ii). Alternativamente, la etapa iii) se puede llevar a cabo durante el mismo periodo de tiempo que la etapa ii) o su comienzo puede ser diferido de 5 minutos a 5 días, tal como de 1 a 12 horas o de 2 a 10 horas o de 4 a 8 horas o de 6 a 8 horas. Típicamente, la etapa de contacto iii) se realiza una vez que se ha alcanzado un "estado estacionario" (a través de la etapa ii) en el que la molécula testigo entra y sale de los endosomas intracelulares a aproximadamente la misma velocidad.

35 El aspecto inhibidor de la presente invención también puede incluir una etapa de eliminación del exceso de la molécula testigo y/o de la molécula inhibidora de prueba. Dicha "etapa de eliminación" se designa como "etapa iiiia)" en el contexto del ensayo del aspecto inhibidor. Todas las formas de realización anteriormente descritas de la etapa de "eliminación" iii) en el contexto del aspecto de ensayo de la "molécula de ensayo" de la presente invención son válidas igualmente para la etapa de "eliminación" iiiia) del aspecto de ensayo de la "molécula inhibidora" de la presente invención.

40 La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

#### Lista de Figuras.

Figura 1. Etapas clave asociadas con la endocitosis. Las 4 etapas clave se marcan 1 a 4.

45 Figura 2. Internalización de un TSI dirigido a células GH3 que expresan GHRHR. Figura 2A: las células fueron incubadas en ausencia de TSI. Figura 2B: las células fueron incubadas en presencia de 3  $\mu$ M de un TSI con una estructura diana de GHRH durante 60 minutos.

Figura 3: Internalización dependiente de la concentración de un TSI dirigido a células GH3 que expresan el GHRHR.

Figura 4: Internalización de un TSI dirigido a pituicitos de rata. Figura 4A: las células se incubaron en ausencia de TSI. Figura 4B: las células se incubaron en presencia de 1  $\mu$ M de un TSI con una estructura diana GHRH durante 60 minutos.

50 Figura 5: Internalización dependiente de la concentración de un TSI con un resto de direccionamiento GHRH en pituicitos de rata. Las células se incubaron con: (•) un TSI que tiene una estructura diana de GHRH; (○) el correspondiente TSI no ligado correspondiente durante 60 minutos.

Figura 6: Internalización y escape endosomal de un TSI dirigido a células GH3 que expresan GHRHR de rata. El régimen de tratamiento continuo se compara con un formato de tratamiento de pulso-caza.

Figura 7: Internalización de un TSI dirigido a células HT-1080. Figura 7A: las células se incubaron en ausencia de TSI. Figura 7B: las células se incubaron en presencia de 2  $\mu\text{M}$  de un TSI con una estructura diana de EGFR durante 60 minutos.

5 Figura 8: Internalización dependiente de la concentración de un TSI dirigido a células CHO-K1 que expresan GHRHR.

**Ejemplos.**

Ejemplo 1.

10 Células A549 fueron sembradas en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 2 días para conseguir una confluencia de  $\sim 90\%$ . El factor de crecimiento epidérmico (EGF) marcado con Alexa-fluor®488 se incubó con células durante 60 minutos. Las células se lavan y después de aumentar los tiempos de incubación se determina la fluorescencia celular total, el recuento de endosomas y la fluorescencia endosómica usando cribados de alto contenido.

Ejemplo 2.

15 Células GH3 que expresan el receptor de la hormona de liberación de hormona del crecimiento de la rata (GHRH) se siembran en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina. Al cabo de 24 horas, un TSI que comprende un dominio de direccionamiento de GHRH (1 - 44) y dominios de translocación y cadena ligera de neurotoxina botulínica de serotipo C se incubó con células durante 30 minutos. Las células se lavan y el TSI unido a la superficie de la célula se elimina mediante lavado con ácido a un tiempo de incubación creciente. Las células se fijan con paraformaldehído y se permeabilizan usando digitonina. La cadena ligera TSI de la neurotoxina C botulínica se detecta usando un anticuerpo primario anti LC de neurotoxina C botulínica de conejo y un anticuerpo secundario marcado con Alexa-fluor®488 anti-conejo de cabra. La acumulación en los endosomas y el escape endosomal se controla usando un rastreo de alto contenido.

Ejemplo 3.

25 Se preparan neuronas embrionarias de la médula espinal y se cultivan en placas de 96 pocillos revestidas con matrigel. La neurotoxina A botulínica se incubó con las neuronas durante 10 minutos, después de lo cual se lavan las células. Las células se permeabilizan usando saponina después de incrementar el tiempo de incubación y el LC de la neurotoxina botulínica se detecta usando una neurotoxina anti-botulínica LC de anticuerpo A. La acumulación en los endosomas y el escape endosomal se monitoriza usando un rastreo de alto contenido.

Ejemplo 4.

30 Células HEK293 que expresan el receptor de la hormona paratiroidea humana PTH1 se siembran en placas de 96 pocillos revestidas con poli-D-lisina. Después de una incubación durante la noche las células se incuban con PTH (1 - 34) marcada con myc durante 45 minutos. Las células se lavan y, después de aumentar el tiempo de incubación, las células se fijan y se permeabilizan con Tween 20. La PTH (1-34) marcada con Myc se detecta usando un anticuerpo anti-myc marcado con rodamina. La acumulación en los endosomas y el escape endosomal se controla mediante un rastreo de alto contenido.

Ejemplo 5.

40 Células CHO-K1 que expresan el receptor de péptido intestinal 1 vasoactivo se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se incuban solas o con concentraciones crecientes de un inhibidor de escape endosomal durante 60 minutos después de lo cual se co-incubó con las células un TSI biotinilado durante 20 minutos. El TSI se elimina mediante lavado y las células se fijan después de aumentar el tiempo de incubación usando paraformaldehído. Las células son permeabilizadas usando digitonina y biotiniladas. El TSI se detecta utilizando estreptavidina y un anticuerpo anti-estreptavidina marcado con alexa-fluor® 488. La acumulación del TSI en los endosomas y el escape endosomal se controlan mediante un rastreo de alto contenido. El efecto del inhibidor se evalúa mediante una tasa reducida de escape endosomal en comparación con células testigo no incubadas con inhibidor.

Ejemplo 6.

50 Células GH3 que expresan el GHRH-R de rata se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se incubaron en presencia (B) y en ausencia (A) de 3  $\mu\text{M}$  de un TSI con una estructura diana GHRH durante 60 minutos. Las células se fijaron y se sondaron con anticuerpo de conejo contra la cadena ligera del TSI y Alexa Fluor® 488 anti-conejo de cabra. Los núcleos se tiñeron usando tinción de Hoescht.

(A) núcleos mostrados en gris pálido sin manchas blancas puntiformes detectadas.

(B) núcleos mostrados teñidos en gris pálido (Figura 2).



Ejemplo 7.

Las células GH3 que expresan el GHRH-R de rata se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de un TSI con una estructura diana GHRH durante 60 minutos. Las células se fijaron y se sondaron con anticuerpo de conejo a la cadena ligera del TSI y de Alexa Fluor® 488 anti-conejo de cabra. El recuento de endosomas se midió mediante rastreo de alto contenido. Los datos son la media ± error estándar media del obtenido en tres experimentos realizados por triplicado (Figura 3).

Ejemplo 8.

Células pituitarias de rata dispersadas fueron cultivadas durante 5 días y se incubaron en presencia (B) y ausencia (A) de 1 µM de un TSI con una estructura diana GHRH durante 60 minutos. Las células se fijaron y se sondaron con anticuerpo de conejo a la cadena ligera del TSI y Alexa Fluor® 488 anti-conejo de cabra. Los núcleos se tiñeron usando tinción de Hoescht. A) núcleos mostrados en gris pálido sin manchas blancas puntiformes detectadas; (B) núcleos mostrados teñidos en gris pálido. Las manchas puntiformes blancas indican la presencia de cadena ligera del TSI en los endosomas (Figura 4).

Ejemplo 9.

Células de pituitaria de rata dispersadas se cultivaron durante 5 días y se incubaron por triplicado con concentraciones crecientes de un TSI que tiene una estructura diana GHRH o el correspondiente TSI no ligado durante 60 minutos. Las células se fijaron y se sondaron con anticuerpo de conejo a la cadena ligera del TSI y Alexa Fluor® 488 anti-conejo de cabra. El recuento de manchas de los endosomas se midió mediante rastreo de alto contenido. Los datos mostrados son la media ± error estándar media de triplicados obtenidos en un experimento (Figura 5).

Ejemplo 10.

Las células GH3 que expresan GHRH-R de rata se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se incubaron por triplicado con 1 µM de un TSI que tiene una estructura diana GHRH para períodos de tiempo en aumento después de lo cual las células se fijaron y se sondaron con anticuerpo de conejo contra la cadena ligera del TSI y Alexa Fluor® 488 anti-conejo de cabra. Las células se incubaron en continuo con TSI o se pulsaron con TSI durante 30 minutos y después se lavaron antes de ser incubadas durante períodos de tiempo crecientes (30, 90, 150 min). En estos momentos las células fueron fijadas y posteriormente se sondaron con anticuerpo contra la cadena ligera de D. El recuento de manchas endosomales se midió mediante rastreo de alto contenido. Los datos son la media ± error estándar media de la obtenida en tres experimentos realizados por triplicado (Figura 6).

Ejemplo 11.

Células HT-1080 que expresan el EGFR humano fueron sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas en presencia (B) y ausencia (A) de 2 µM de un TSI con una estructura diana EGFR durante 60 minutos. Las células fueron fijadas y sondadas con anticuerpo de conejo contra la cadena ligera del TSI y Alexa Fluor® 488 anti-conejo de cabra. Los núcleos se tiñeron usando tinción de Hoescht. (A) núcleos mostrados en gris pálido sin manchas blancas puntiformes detectadas. (B) núcleos mostrados teñidos en gris pálido. Las manchas blancas puntiformes indican la presencia de cadena ligera del TSI en los endosomas (Figura 7).

Ejemplo 12.

Células CHO-K1 que expresan el GHRHR fueron sembradas en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se incubaron por triplicado con concentraciones crecientes de un TSI que tiene una estructura diana GHRH y dominios de translocación y de cadena ligera de neurotoxina botulínica de serotipo A durante 30 min. Las células se fijaron, se permeabilizaron con digitonina y se analizaron con anticuerpo de conejo contra la cadena ligera de la TSI y Alexa Fluor® 488 anti-conejo de cabra. El recuento de vesículas por célula se midió mediante rastreo de alto contenido. Los datos mostrados son la media ± error estándar media de 3 experimentos realizados por triplicado (Figura 8).

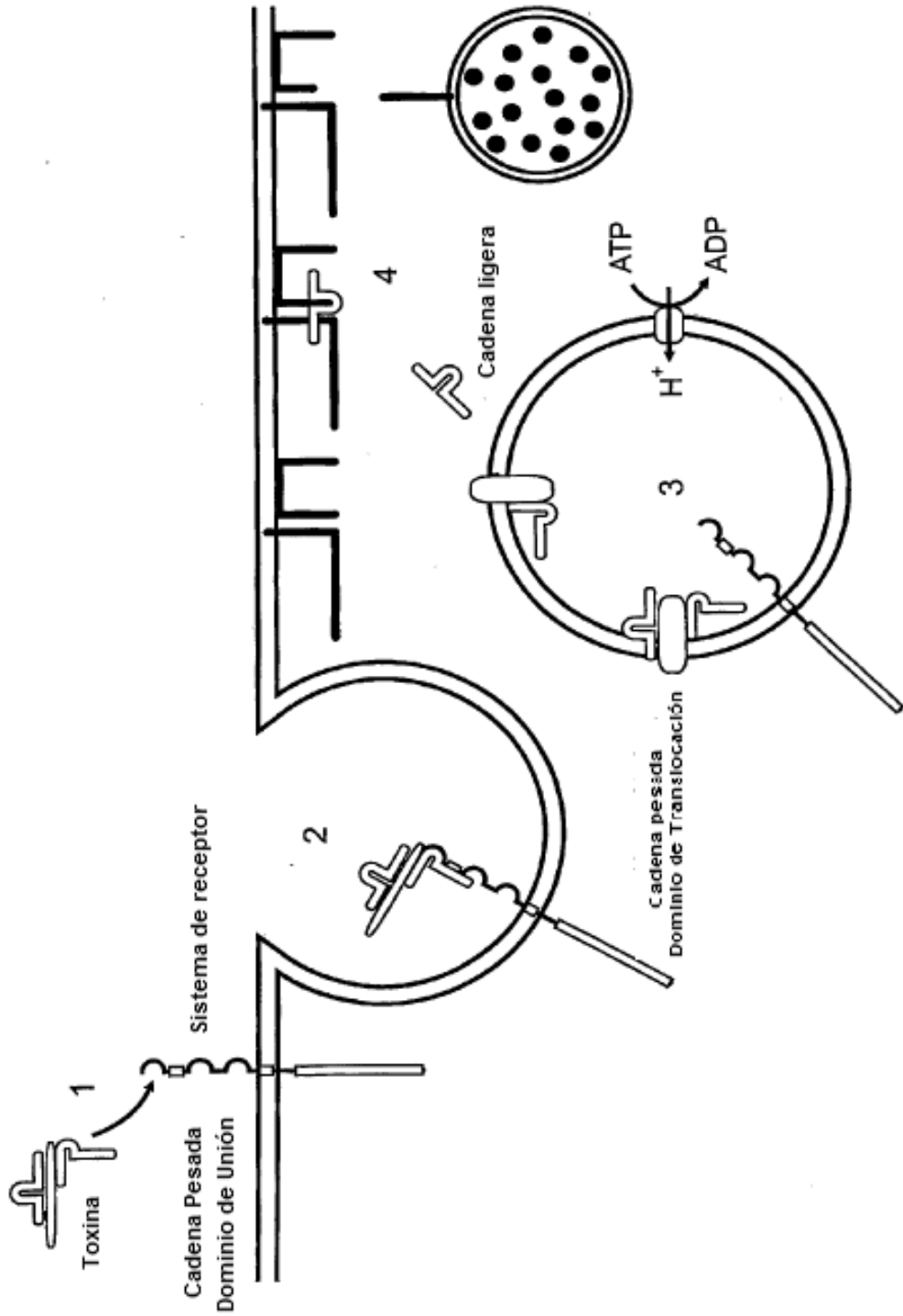
**REIVINDICACIONES**

- 1ª. Un ensayo para evaluar la capacidad de liberación de endosomas de una molécula de ensayo, en donde dicha molécula de ensayo es una neurotoxina clostridial o una proteasa no citotóxica re-dirigida (inhibidor de secreción dirigido) en donde la capacidad de unión natural de la proteasa no citotóxica ha sido modificada por la introducción de un ligando de unión o de una estructura diana, y
- 5 en donde dicha molécula de ensayo tiene la capacidad de segmentar proteolíticamente e inactivar una proteína SNARE;
- comprendiendo dicho ensayo:
- 10 i) poner en contacto una célula eucariota con una molécula de ensayo que se ha de evaluar en relación con la capacidad de liberación de endosomas, en donde dicha célula eucariota comprende una membrana celular que incluye un sitio de unión presente en la superficie externa de la membrana celular de dicha célula;
- ii) incubar la molécula de ensayo con dicha célula eucariota, y permitir de esta forma:
- 15 a) que la molécula de ensayo se una y forme un complejo unido con el sitio de unión presente en la célula eucariota, permitiendo así que dicho complejo unido se introduzca en la célula eucariota mediante endocitosis;
- b) que se formen uno o más endosomas dentro de dicha célula, en donde el uno o más endosomas contienen la molécula de ensayo; y
- c) que dicha molécula de ensayo entre en el citosol de la célula eucariota cruzando la membrana endosomal del uno o más endosomas;
- 20 iii) eliminar el exceso de molécula de ensayo que no está unido a los sitios de unión presentes en las células eucariotas;
- iv) después de un período de tiempo predeterminado, detectar la cantidad de molécula de ensayo presente en el uno o más endosomas, o detectar la cantidad de molécula de ensayo presente en el citosol de dicha célula eucariota;
- 25 v) comparar la cantidad de molécula de ensayo detectada en la etapa iv) con un valor testigo, en donde dicho valor testigo representa la cantidad de molécula de ensayo presente en el uno o más endosomas o la cantidad de molécula de ensayo presente en el citosol antes de la etapa iv);
- vi) calcular un valor de liberación de endosomas para la molécula de ensayo determinando el cambio relativo de la cantidad de molécula de ensayo que está presente dentro del uno o más endosomas o determinando el cambio relativo de la cantidad de molécula de ensayo presente en el citosol de dicha célula eucariota.
- 30 en donde dicha etapa (iv) comprende detectar la molécula de ensayo usando un marcador fluorescente.
- 2ª. Un ensayo según la reivindicación 1ª, en donde la célula eucariota se elige entre una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de vertebrado, una célula de mamífero, una célula vegetal y una célula fúngica.
- 3ª. Un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de incubación ii) tiene lugar durante un periodo de tiempo de 5 minutos a 5 días, tal como de 1 a 12 horas, o de 2 a 10 horas, o de 4 a 8 horas, o de 6 a 8 horas.
- 35 4ª. Un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de detección iv) se lleva a cabo entre 5 minutos y 5 horas después de la etapa iii), tal como de 15 a 240 minutos o de 30 a 180 minutos o de 45 a 150 minutos después de la etapa iii).
- 5ª. Un ensayo para evaluar los efectos inhibidores de una molécula de bloqueo sobre el transporte endosomal en una célula eucariota, comprendiendo dicho ensayo:
- 40 i) poner en contacto una célula eucariota con una molécula testigo que se une a un sitio de unión presente en la superficie de dicha célula eucariota, en donde dicha molécula testigo es una neurotoxina clostridial o una proteasa no citotóxica re-dirigida (inhibidor de secreción direccionado) en el que la capacidad de unión natural de la proteasa no citotóxica ha sido modificada mediante la introducción de un ligando de unión o estructura diana, y en donde dicha molécula testigo tiene la capacidad de segmentar proteolíticamente e inactivar una proteína SNARE, en donde dicha molécula testigo forma un complejo unido con el sitio de unión, se introduce en la célula eucariota mediante endocitosis durante la cual se forma un endosoma que contiene la molécula testigo, y en donde dicha molécula testigo entra en el citosol de la célula eucariota cruzando la membrana endosomal del endosoma.
- 45 ii) incubar la molécula testigo con dicha célula eucariota, y permitir así

- a) que la molécula testigo se una y forme un complejo unido con el sitio de unión presente en la célula eucariota, permitiendo de este modo que dicho complejo unido entre en la célula eucariota por endocitosis;
- b) que uno o más endosomas se formen dentro de dicha célula, en donde el uno o más endosomas contienen la molécula testigo; y
- 5 c) que dicha molécula testigo entre en el citosol de la célula eucariota cruzando la membrana endosomal del uno o más endosomas;
- iii) poner en contacto la célula eucariota con una molécula inhibidora de ensayo que se va a evaluar en relación con su capacidad para suprimir la liberación endosomal de molécula testigo de los endosomas.
- 10 iv) después de un periodo de tiempo predeterminado, detectar la cantidad de molécula testigo presente en el uno o más endosomas, o detectar la cantidad de molécula testigo presente en el citosol de dicha célula eucariota;
- v) comparar la cantidad de molécula testigo detectada en la etapa iv) con un valor de control, en donde dicho valor de control representa la cantidad de molécula testigo presente en uno o más endosomas o la cantidad de molécula testigo presente en el citosol antes de la etapa iii);
- 15 vi) asignar un valor de inhibición para la molécula de inhibición de ensayo determinando el cambio relativo en la cantidad de molécula testigo que está presente dentro del uno o más endosomas, o determinando el cambio relativo en la cantidad de molécula testigo presente en el citosol de dicha célula eucariota, en donde la etapa (iv) comprende detectar la molécula testigo usando un marcador fluorescente.
- 6<sup>a</sup>. Un ensayo según la reivindicación 5<sup>a</sup>, en donde la célula eucariota se elige entre una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de vertebrado, una célula de mamífero, una célula vegetal y una célula fúngica.
- 20 7<sup>a</sup>. Un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>, en donde la etapa de incubación ii) tiene lugar durante un periodo de tiempo de 5 minutos a 5 días, tal como de 1 a 12 horas, o de 2 a 10 horas, o de 4 a 8 horas, o de 6 a 8 horas.
- 8<sup>a</sup>. Un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 5<sup>a</sup> a 7<sup>a</sup>, en donde la etapa de detección iv) se realiza durante un tiempo entre 5 minutos y 5 horas después de la etapa iii), tal como de 15 a 240 minutos o de 30 a 180 minutos o de 45 a 150 minutos después de la etapa iii).
- 25 9<sup>a</sup>. Un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 5<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup>, en donde la etapa de contacto ii) se realiza entre 5 minutos y 5 días después del comienzo de la etapa de incubación ii), tal como entre 30 minutos y 12 horas o entre 30 minutos y 10 horas o entre 30 minutos y 8 horas, o entre 1 y 8 horas después del comienzo de la etapa de incubación ii).

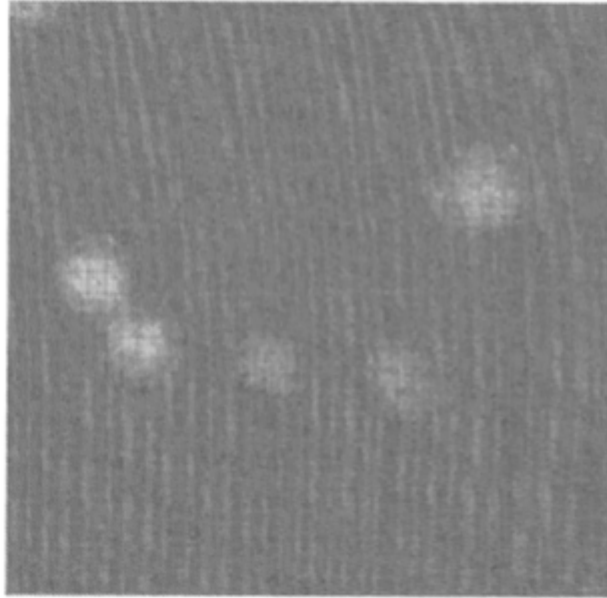
30

Figura 1



**Figura 2**

**A**



**B**

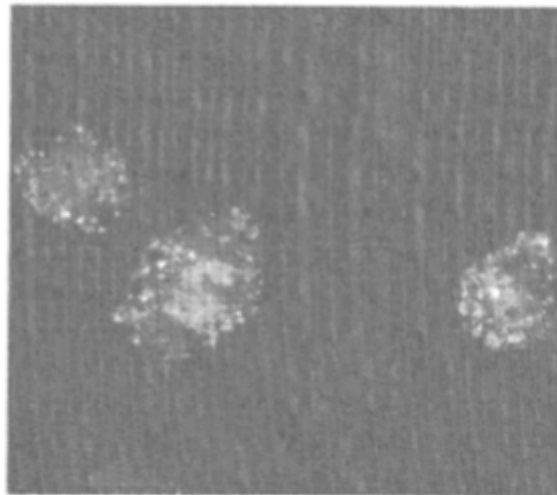
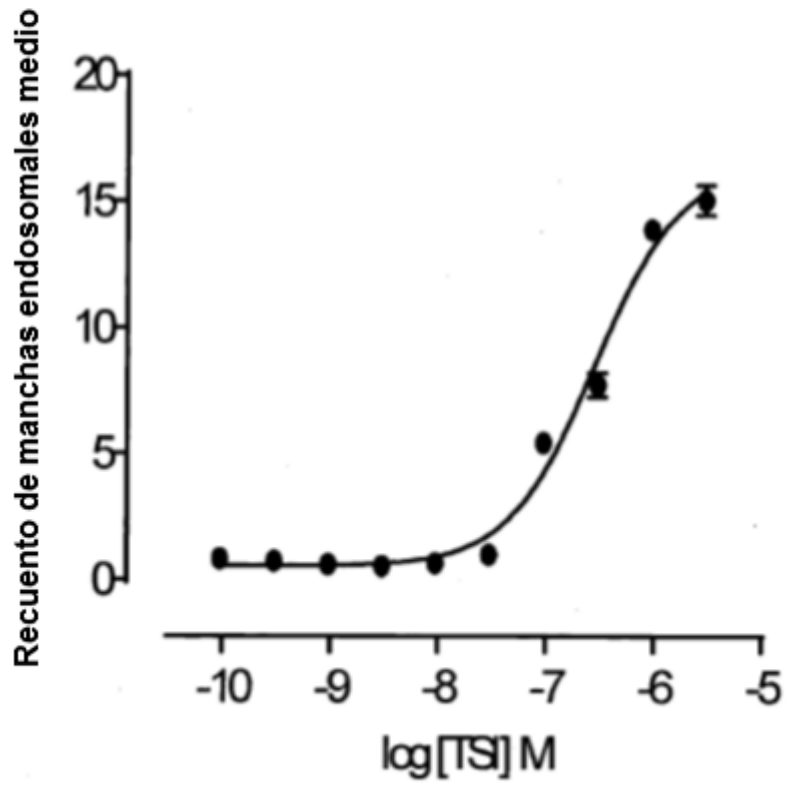
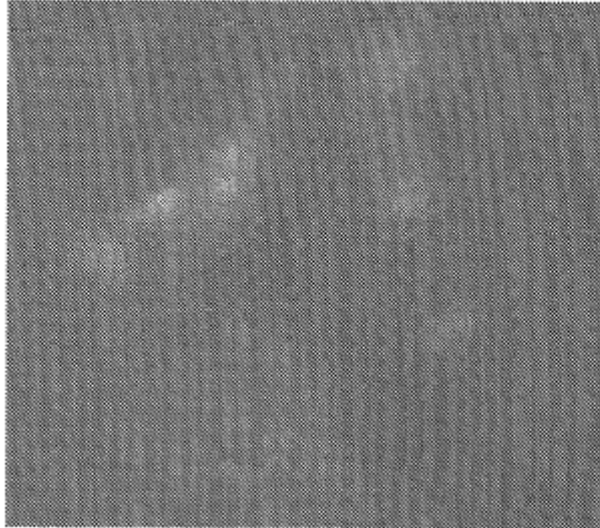


Figura 3



**Figura 4**

**A**



**B**

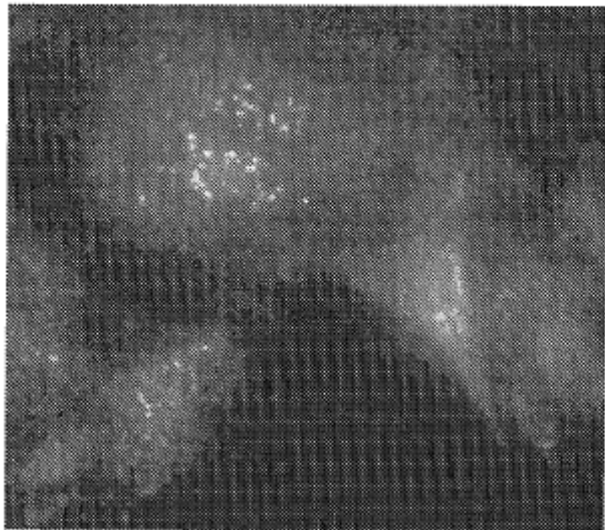


Figura 5

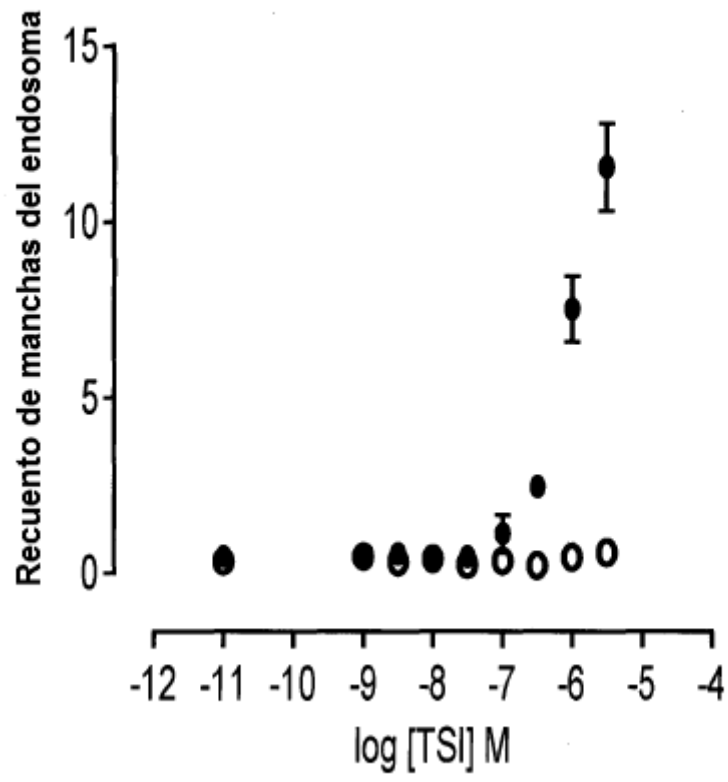
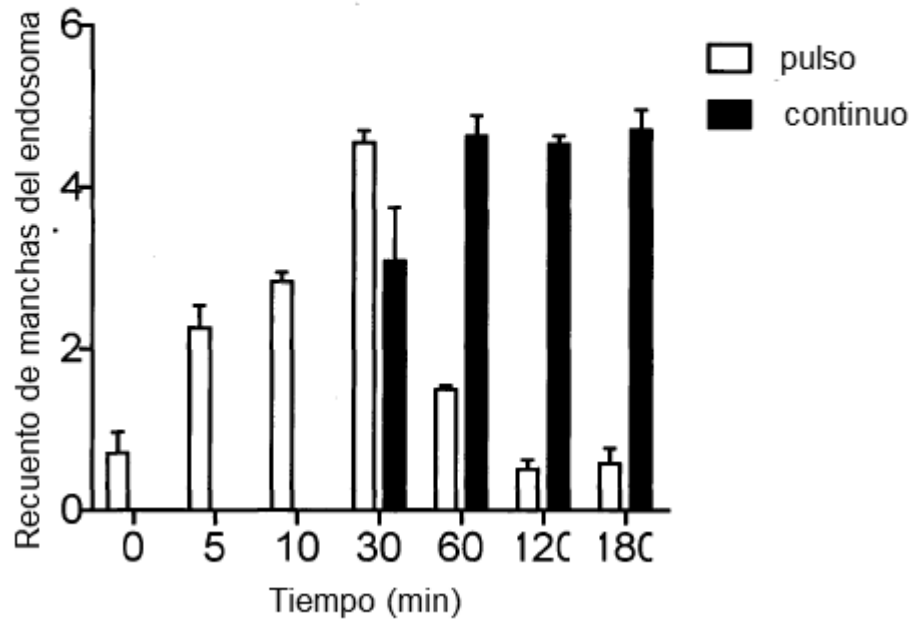


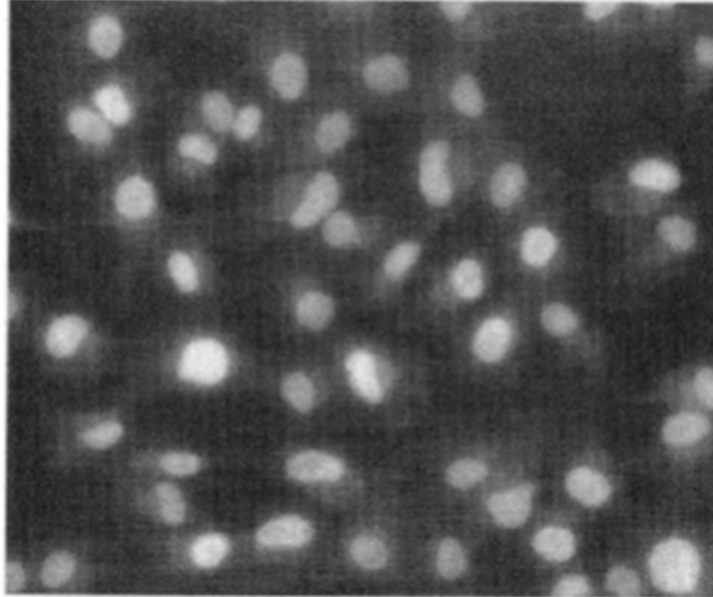


Figura 6



**Figura 7**

**A**



**B**

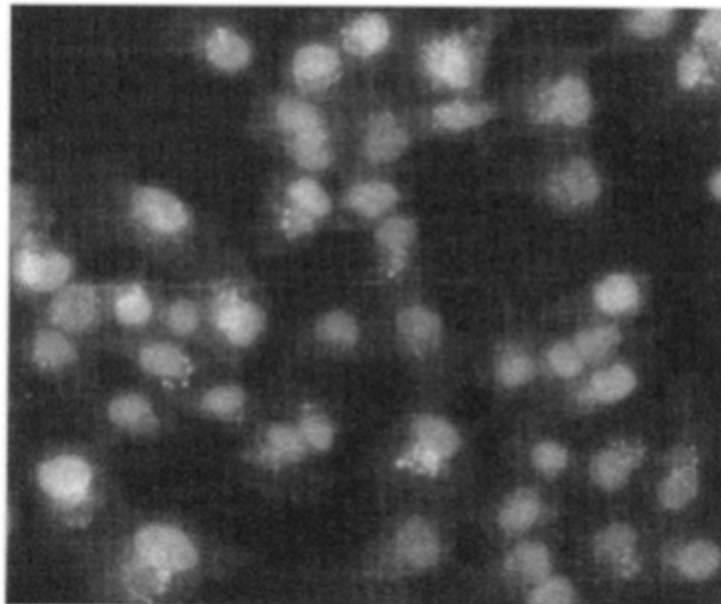


Figura 8

