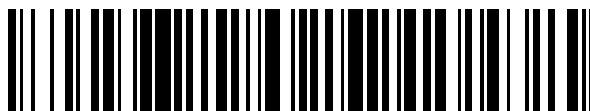


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 003**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2014** **PCT/PL2014/050080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015** **WO15099548**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2014** **E 14835589 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 3087096**

54 Título: **Un anticuerpo que posee una afinidad por el tejido secretor epitelial y nervioso, así como el tejido tumoral derivado de estos tejidos, así como el uso de los mismos**

30 Prioridad:

27.12.2013 PL 40669413

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2020

73 Titular/es:

**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOSWIADCZALNEJ PAN (50.0%)
Ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław, PL y
UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW
SLASKICH WE WROCLAWIU (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KORZENIOWSKA-KOWAL, AGNIESZKA;
KOCHMAN, AGATA;
ZIÓLKOWSKI, PIOTR y
GAMIAN, ANDRZEJ**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 796 003 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

Un anticuerpo que posee una afinidad por el tejido secretor epitelial y nervioso, así como el tejido tumoral derivado de estos tejidos, así como el uso de los mismos

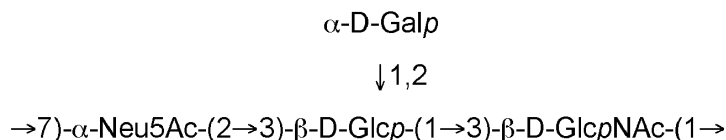
5 La presente invención se refiere a un nuevo uso de antígenos bacterianos y anticuerpos obtenidos de acuerdo con este uso. Los anticuerpos resultantes pueden usarse en el diagnóstico de tumores mediante inmunohistoquímica y en la unión de fármacos a anticuerpos para su aplicación en la terapia contra el cáncer.

10 El lipopolisacárido (LPS) es una molécula de endotoxina ubicada sobre la superficie celular de las bacterias Gram negativas. Consiste en un componente tóxico, el lípido A, una región central y un antígeno O-polisacárido que es específico para cada serotipo [1]. Los serotipos O24 y O56 de *Escherichia coli* se caracterizan por la presencia de ácido siálico en su lipopolisacárido. La presencia de ácido siálico en LPS contribuye a la patogenicidad de las bacterias mediante un mecanismo de mimetismo molecular, es decir, compartiendo un epítipo común con las estructuras del anfitrión [2]. La presencia de epítipos bacterianos estructuralmente similares a los antígenos del anfitrión, el fenómeno de mimetismo molecular puede interrumpir la respuesta inmunitaria del anfitrión. Los polisacáridos específicos de O del lipopolisacárido de *E. coli* O24 y O56 tienen una secuencia similar de azúcares con una estructura común $\rightarrow 7) - \alpha\text{-NeuNAc} - (2 \rightarrow 3) - \beta\text{-D-Glc} (1 \rightarrow$. El ácido siálico es glicosilado por $\beta\text{-D-GlcpNAc}$ en el polisacárido de O56 y por $\beta\text{-D-GalpNAc}$ en O24 respectivamente [3]. El mimetismo molecular basado en la presencia de epítipos de ácido siálico en común con las estructuras del anfitrión puede estar respaldado por un ejemplo bien conocido de un ácido colomínico bacteriano que es estructuralmente idéntico a un polisialil-glicoconjugado de tejido [4], o a un polisacárido O37 específico de O de *Citrobacter* que presenta reacción cruzada con la glicoproteína de la banda 3 de los eritrocitos humanos [5]. Tiene importancia especial la expresión de ácido siálico sobre la superficie de las células tumorales, lo que indica una relación funcional con el fenotipo neoplásmico. La progresión de la transformación y la metástasis se acompañan de cambios en las cantidades, conectividad y tipos de ácidos siálicos en la superficie de las células tumorales [6].

25 El reconocimiento específico de cánceres particulares sigue siendo un problema que necesita una solución. Es particularmente deseable proporcionar una nueva herramienta de diagnóstico para la identificación y diferenciación de cánceres epiteliales secretores y tejido nervioso.

Inesperadamente, se comprobó que el problema definido anteriormente se ha resuelto en la presente invención.

30 El sujeto de la presente invención es un anticuerpo que tiene afinidad por el tejido epitelial secretor y nervioso y el tejido tumoral derivado de estos tejidos que reconoce un antígeno bacteriano que comprende un motivo estructural definido por la fórmula:



Otro objeto de la invención es un kit de diagnóstico para la detección de células epiteliales secretoras y tejido neural y células tumorales derivadas de estos tejidos, que comprende un anticuerpo como se definió anteriormente.

35 Otro tema de la presente invención es el uso del antígeno definido por la fórmula anterior en la producción de anticuerpos específicos para el tejido epitelial secretor y nervioso y el tejido tumoral derivado de estos tejidos.

Preferiblemente, los anticuerpos se producen para el diagnóstico de tumores.

Otro tema de la presente invención es un método para la preparación de anticuerpos específicos para el tejido epitelial secretor y nervioso, caracterizado porque el mamífero se inmuniza con un antígeno bacteriano definido por la fórmula anterior, a continuación, se aíslan los anticuerpos que reconocen el antígeno.

40 Preferiblemente, los anticuerpos se aíslan usando cromatografía de afinidad sobre una columna empaquetada con un portador que contiene el antígeno inmovilizado definido por la fórmula anterior.

45 Inesperadamente, como resultado de la investigación que forma la base de la presente invención, resultó que los tejidos humanos seleccionados son reconocidos específicamente por anti-A24 o anti-O56, aunque algunos de los epítipos fueron reconocidos tanto por anti-A24 como por anti-O56. Además, se encontró una reactividad preferente con anti-O56. Muchos tejidos analizados no reaccionaron con ninguno de los dos anticuerpos, lo que confirma la especificidad del fenómeno observado.

50 Los experimentos de inmunohistoquímica demostraron que los anticuerpos contra el polisacárido específico de O de *Escherichia coli* O24 y O56 reconocen diferentes epítipos en tejidos humanos. Un hecho inesperado es el reconocimiento de estructuras tisulares por anticuerpos de conejo obtenidos después de la inmunización con células bacterianas de *Escherichia coli* O24 y O56, cromatografía de afinidad de purificación en una columna de

lipopolisacárido inmovilizado. Inesperadamente, los autores de la presente invención observaron la alta reactividad de estos anticuerpos antibacterianos con el tejido tumoral, especialmente el tejido canceroso, y la especificidad particular por el tejido epitelial secretor y neural. Particularmente interesante es la reactividad descubierta de la reactividad antitumoral anti-O24 y O56 con varias estructuras que se pueden utilizar en el diagnóstico del cáncer y en oncología.

- 5 Para facilitar una mejor comprensión de la presente invención, la descripción anterior se ha enriquecido con las figuras adjuntas y la discusión de ejemplos de realizaciones ilustrativas de la presente invención.

Lista de Figuras:

FIG. 1. Estructura del polisacárido específico de O de *E. coli* O24 y O56.

- 10 Fig. 2. Análisis SDS-PAGE de lipopolisacárido de *E. coli* serotipo O24 (1) y O56 (2) (A) e inmunotransferencia con anticuerpos de conejo utilizando anti-*E. coli* O24 (B) y anti-*E. coli* O56 (C) purificados por afinidad.

Fig. 3. Adenocarcinoma metastásico del colon en el hígado. Se observa una fuerte tinción positiva en las células secretoras de la metástasis con anti-O56; LSAB, contrateñido con hematoxilina, aumento 100x.

Fig. 4. Carcinoma hepatocelular (CHC). Las células HCC revelan una fuerte reacción con el anti-O56 disperso; LSAB, contrateñido con hematoxilina, aumento 100x.

- 15 Fig. 5. Cáncer de células del conducto biliar (CCC). Las células CCC revelan una reacción dispersa muy fuerte con anticuerpos anti-O56; LSAB, contrateñido con hematoxilina, aumento 100x.

Fig. 6. Neuroma de bobina. Visible en el centro de la microfotografía es una respuesta positiva moderada de las células ganglionares del tumor benigno con anti-O56; LSAB, contrateñido con hematoxilina, aumento 100x.

- 20 Fig. 7. Rechazo de trasplante renal crónico. Las células tubulares renales muestran una fuerte tinción positiva con anti-O56; LSAB, contrateñido con hematoxilina, aumento 100x.

Fig. 8. Bobinas neuronales. Las células ganglionares muestran una reacción positiva moderada con anti-O56; LSAB, contrateñido con hematoxilina, aumento 100x.

Fig. 9. Glándula tiroides. Los tirocitos (células epiteliales de la tiroides) en la tiroides normal muestran una fuerte reacción con el anticuerpo anti-O56; LSAB, contrateñido con hematoxilina, aumento 100x.

- 25 **Ejemplo 1. Preparación de los anticuerpos de la presente invención.**

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

- 30 Las cepas bacterianas se obtuvieron de la Colección Polaca de Microorganismos (PCM) en el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental, Academia Polaca de Ciencias de Wroclaw. *Escherichia coli* O24 (PCM 195) y O56 (PCM 2372) fueron las mismas que las utilizados anteriormente [3]. Las bacterias se cultivaron en caldo de Davis nutritivo, con un suplemento de producto hidrolizado de caseína y extracto de levadura (Difco), con aireación a 37°C. Después de 24 h, las células se recogieron y se liofilizaron. Los lipopolisacáridos se obtuvieron por extracción utilizando fenol-agua y se purificaron por ultracentrifugación [7].

Aislamiento y análisis de LPS, utilizando el método de la proteinasa K.

- 35 Un procedimiento original [8] se modificó ligeramente de la siguiente manera. La suspensión bacteriana en solución salina tamponada con fosfato (PBS) se ajustó a una concentración con una densidad óptica uniforme de A600 = 0,3, a continuación, se centrifugaron 1,5 ml de este material (13.000 g, 4°C, 15 min). Las células sedimentadas se resuspendieron en 200 µl de tampón Tris-HCl 10 mM que contenía EDTA, glicerol y SDS, se hirvieron durante 10 minutos y se trataron con proteinasa K a 60°C durante 2 horas. Después de la eliminación del precipitado, la solución se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, seguido de un ensayo de inmunotransferencia.

Preparación de suero

- 45 Los conejos fueron inmunizados con bacterias liofilizadas suspendidas en PBS, inicialmente por vía subcutánea a una dosis de 100 mg de células secas por 1 ml en PBS y a continuación por vía intravenosa dos veces por semana con cantidades crecientes de bacterias (100 a 6400 mg/ml de PBS). Una semana después de la última inmunización, los conejos se desangraron y el suero se separó y el complemento se inactivó por calor (56°C, 30 min) y se almacenó a -20°C [9].

Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad utilizando lipopolisacáridos unidos.

- 50 Se obtuvo la forma soluble de lipopolisacárido de *E. coli* O24 y O56 (20 mg) suspendiéndolo en 2 ml de SDS al 2% en 200 ml de EDTA 0,5 M y a continuación tres veces por precipitación con etanol (1:4, v/v) y centrifugación (12.000 rpm por minuto durante 20 minutos). El LPS se disolvió en agua (1 mL), se sometió a sonicación y se hizo pasar a través

de una columna Dowex H+ o Dowex Na+ para obtener preparaciones, respectivamente, de sales ácidas o de sodio. Los anticuerpos se aislaron de sueros de conejo contra *E. coli* O24 y O56 (20 ml) diluidos en PBS (1:2, v/v) después de la precipitación por adición de sal con sulfato de amonio (9,6 g (NH₄)₂SO₄), 4°C, 1 h, 30 minutos de centrifugación de 3000 xg, 25°C). Los anticuerpos precipitados se disolvieron en 5 ml de PBS y se sometieron a diálisis frente a PBS a 4°C. La columna de afinidad se preparó uniendo la forma ácida de LPS a gel de sílice C18 en DMSO, después de lavar el LPS no unido con metanol al 50%, esto se empaquetó en una columna (1x10 cm) en metanol al 50%, se lavó con agua y PBS, a continuación, se bloqueó con caseína al 1% en PBS y se lavó con PBS con seguimiento a 280 nm. Los anticuerpos precipitados por adición de sal (0,5 ml) se unieron a la columna de afinidad con gel de sílice C18 unido a LPS, se lavaron con PBS para eliminar la proteína no unida y el anticuerpo se eluyó con KSCN 3 M en PBS, se sometió a diálisis contra PBS y a continuación se almacenó en glicerol al 50% a -20°C.

Ejemplo 2: Uso de anticuerpos según la presente invención

SDS-PAGE e inmunotransferencia

Se realizó SDS-PAGE mediante el método Laemmli [10] utilizando un gel de poliacrilamida al 15% como se describió anteriormente [3]. En resumen, el LPS se resuspendió (1 mg/ml) en tampón de muestra o muestras tratadas con proteinasa K, y el extracto bacteriano se hirvió durante 5 minutos y se cargaron 10 ml en el gel. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con plata según Tsai y Frash [11,12]. Después de SDS-PAGE, el material de prueba de inmunotransferencia se transfirió electroforéticamente desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher-Schuell, 0,45 µm) como se describió anteriormente [13]. Las membranas se incubaron durante la noche a 36°C en un suero de conejo diluido 1:200 con gelatina al 1% (p/v), se lavaron con solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 7,5) y a continuación se incubaron con anti-IgG de conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1:5000 en TBS que contenía gelatina al 1% (p/v) durante 1 hora a 36°C. La membrana se tiñó con 4-cloro-1-naftol en presencia de H₂O₂.

Tinción inmunohistoquímica

Se cortaron secciones de tejido humano, se fijaron en formalina (4%) y se incluyeron en parafina (FFPE), a partir de bloques de secciones de 4 µm y se desparafinaron. En el procedimiento se utilizó un kit de inmunoperoxidasa ABC de DAKO: la peroxidasa endógena se bloqueó con reactivo de bloqueo y agua destilada a temperatura ambiente (15 min); a continuación tampón de citrato ácido de pH 6,0 (2 x 8 min por primera vez en el microondas a una potencia de 350 W, y a continuación a temperatura ambiente), TBS (0,05 mmoles, pH 7,6) con suero porcino 1:50 (0,5 horas a temperatura ambiente), agua destilada, el anticuerpo de prueba (150 µl/formulación, 40°C, durante la noche) TBS; reactivo LSAB (30 min), tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (5 min). Las secciones se tiñeron con hematoxilina y se incluyeron en la capa de resina. Los controles negativos se realizaron en TBS y sin el anticuerpo primario.

Resultados

Se cultivaron células bacterianas de los serotipos O24 y O56 de *E. coli* en medio líquido para obtener y analizar el lipopolisacárido. Las preparaciones de LPS se aislaron de la masa celular mediante extracción con fenol-agua a escala preparativa. El método de aislamiento de LPS con proteinasa K se utiliza en el análisis cuantitativo. Las estructuras de los polisacáridos que contienen ácido siálico se han establecido previamente [3], se muestran en la Fig. 1. Los LPS purificados se unieron a una fase sólida y una columna de afinidad preparada a partir de la forma ácida de LPS y gel de sílice C18. Se prepararon antisueros policlonales de conejo contra células bacterianas completas. Para la purificación de anticuerpos utilizando afinidad, las fracciones de inmunoglobulina se precipitaron con sulfato de amonio. Los anticuerpos de esta fracción se unieron específicamente a LPS inmovilizado y se eluyeron con KSCN. El anticuerpo obtenido se sometió a continuación a SDS-PAGE seguido de un análisis de inmunotransferencia. Como se muestra en la Fig. 2, los anticuerpos resultantes reconocen los lipopolisacáridos correspondientes. Cabe señalar que, en particular, los anticuerpos contra *E. coli* O24 mostraron reactividad cruzada con el LPS de *E. coli* O56, mientras que los anticuerpos anti-O56 deben considerarse como solo reactivos con el LPS homólogo. Este método suave de unión de LPS es particularmente valioso en el caso de compuestos lábiles, tales como los polisacáridos que contienen ácido siálico. Los anti-*E. coli* O56 reconocen largas cadenas de moléculas de LPS presentes en pequeñas cantidades, que han sido difíciles de visualizar utilizando tinción con plata. Las diferencias estructurales entre las unidades específicas de O son responsables de la falta de reactividad cruzada serológica con *E. coli* O56, pero tienen una cadena principal de azúcar similar. Los anticuerpos de conejo obtenidos mediante purificación utilizando la reacción de afinidad se investigaron mediante inmunohistoquímica con tiras seleccionadas de tejidos humanos. Para estos experimentos los autores de la presente invención utilizaron tejidos sanos normales, así como preparaciones renales rechazadas, derivadas de los tumores benignos y malignos originales, y cáncer metastásico. Los resultados se muestran en la figura 3-9. No se ha demostrado ninguna tinción para ninguno de los anticuerpos (O24 y O56) en:

1. Los siguientes tejidos y células normales: glándulas paratiroides, glándulas suprarrenales, vasos linfáticos o vasos sanguíneos, epitelio escamoso bronquial, epitelio seroso ovárico, hueso, células T y B, macrófagos, granulocitos y células nerviosas,
2. Tumores benignos: lipomas y papilomas,

3. Cánceres, tales como el tumor del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer, cáncer de nasofaringe y de células escamosas bronquiales de células pequeñas, carcinoma de células basales, melanoma maligno y sarcoma graso.

Los autores de la presente invención observaron una intensa respuesta positiva de anticuerpos de anticuerpo contra *E. coli* O56 en células de adenocarcinoma bronquial (adenocarcinoma) y metástasis de cáncer de hígado con adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado, donde las glándulas son menos regulares (Fig. 3). Se encontró una reacción similar con el anticuerpo en el adenocarcinoma de páncreas y el cáncer de endometrio ligeramente más débil (datos no mostrados). Estos anticuerpos reaccionan con un antígeno aún no caracterizado presente en los hepatocitos, como se muestra en la Fig. 4. Según la naturaleza granular de la tinción intracelular, se puede suponer que el epítipo puede estar ubicado en el citoplasma [14]. La inmunohistoquímica juega un papel importante en la distinción del carcinoma hepatocelular (CHC) de los otros tumores primarios y metastásicos. Se sabe que todavía no se ha establecido un marcador más específico o sensible para el CHC. En este caso, se recomienda utilizar una biblioteca inmunohistoquímica que incluya una pluralidad de anticuerpos, tales como los específicos para un hepatocito de antígeno PCEA, MOC-31, CD34, TTF-1 [15]. Basándose en esta información, se puede sugerir que un anticuerpo contra *E. coli* O56 es útil combinado con otros marcadores conocidos, y no se puede utilizar como un único marcador. Una reacción de anticuerpos positiva a cualquiera de los anticuerpos contra O56 y O24 de *E. coli* se encuentra en muchos tumores malignos juveniles, por ejemplo. El hepatoblastoma, los gliomas germinales o el meningioma, generalmente están en una forma leve y se observa una reacción muy fuerte para los cánceres del conducto biliar (Fig. 5). Curiosamente, un tumor benigno, el neuroganglioma demuestra que los tejidos de origen neuroectodérmico son reconocidos por anticuerpos contra *E. coli* O56 (Fig. 6) y solo se encontró traza de reactividad con *E. coli* O24. Las células normales del túbulo renal (FIG. 7), las células ganglionares (Fig. 8) y las células epiteliales tiroideas normales de la glándula tiroides (Fig. 9) se tiñeron con ambos anticuerpos y demostraron una reacción mucho más fuerte con el anticuerpo contra *E. coli* O56. Durante las pruebas con tejidos neuroectodérmicos (ganglios, nervios y cerebro), los autores de la presente invención demostraron la reactividad de su anticuerpo en los tejidos normales (ganglios) así como en el tejido tumoral (neuroganglioma). Las glándulas digestivas, derivadas del endodermo y la glándula tiroides, también mostraron una reacción positiva con el anticuerpo contra *E. coli* O56. Una observación interesante es que el timo, el bazo y las amígdalas normales no muestran inmunorreactividad, lo que indica que los resultados son significativos.

En general, los anticuerpos contra *E. coli* O56 son más reactivos en la tinción de tejido nervioso y células epiteliales que los anticuerpos contra *E. coli* O24. El sistema nervioso está coloreado en tejidos normales (ganglios) y en el caso de tumores (neuroganglioma). Con respecto al epitelio, cada tipo de este tejido tiene una función biológica diferente y muchas proteínas biomarcadoras específicas. Los marcadores funcionales que generalmente se expresan mediante neoplasias epiteliales son útiles para la diferenciación inmunohistoquímica de tumores metastásicos de origen desconocido. Los resultados de los experimentos de los autores de la presente invención indican que los cánceres de tejidos secretores, metástasis, el epitelio de los túbulos renales y el epitelio de la glándula tiroides se tiñeron, pero el epitelio de la piel definitivamente no se tiñó (resultados no mostrados). En base a estos hallazgos, los autores de la presente invención creen que los anticuerpos contra *E. coli* O56 se deben considerar más bien como un biomarcador del epitelio secretor. Por lo tanto, la observación más importante es que el epítipo reconocido por los anticuerpos anti-O56 es un nuevo marcador, específico para el tejido epitelial secretor y nervioso.

Bibliografía

1. Brade H., Opal S.M., Vogel S.N. y Morrison D.C. (eds) Endotoxin in Health and Disease. Macel Dekker, Inc., New York 1999
2. Corfield A.P., Schauer R. 1982: Occurrence of sialic acids, In: Sialic acids, chemistry, metabolism and function. Ed.: Schauer R. Cell Biol. Monogr. 10: 5-50.
3. Gamian A., Kenne L., Mieszata M., Ulrich J., Defaye J. 1994: Structure of the Escherichia coli O24 and O56 O-specific sialic-acid-containing polysaccharides and linkage of these structures to the core region in lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 225: 1211-1220.
4. Janas et al, 1991
5. Ebaid H., Duk M., Gamian A. Antibodies against Citrobacter braakii O37 cells recognize the N -glycan of the band 3 glycoprotein of human erythrocyte membrane. FEMS Immunol Med Microbiol 52 (2008) 352-361.
6. Schultz M.J., Swindall A.F., Bellis S.L., Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. Cancer Metastasis Rev., published online, 2012
7. Westphal O., Jann K., Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol water and further applications of the procedure, Methods Carbohydr. Chem., 5, 1965, 83-92
8. Hitchcock P.J., Brown T.M., Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels, J. Bacteriol., 154, 1983, 269-277.
9. Gamian A., Romanowska A., Romanowska E. 1992b: Immunochemical studies on sialic acid-containing

lipopolysaccharides from Enterobacterial species. FEMS Microbiol. Immunol. 89: 323-328.

10. Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227, 1970, 680-685

5 11. Tsai C. M., Frash C. E., A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 119, 1982, 115-119

12. Fomsgaard A., Freudenberg M.A. y Galanos C., Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. J.Clin.Microbiol. 1990, 28; 2627-2631.

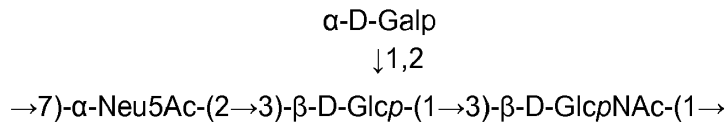
13. Towbin H., Staehelin T. y Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76; 4350-4354.

10 14. Minervini M.I., Demetris A.J., Lee R.G., et al., Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. Mol. Pathol., 1997, 10, 686-692

15. Ordonez N.G., Broad-spectrum immunohistochemical epithelial markers: a review. Human Pathology 2013, 44, 1195-1215

REIVINDICACIONES

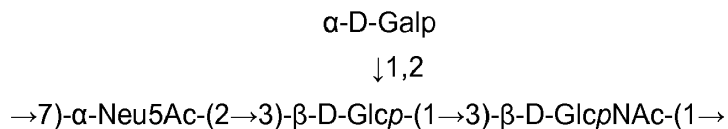
1. Uso de un anticuerpo dirigido contra el antígeno bacteriano que comprende un motivo estructural definido por la fórmula:



5 en un antígeno bacteriano para la detección *in vitro* de células epiteliales glandulares, células de tejido nervioso o de tejido tumoral derivadas de estos tejidos.

2. Un kit de diagnóstico para su uso en la detección de células epiteliales glandulares, células de tejido nervioso o tejido tumoral derivadas de estos tejidos, caracterizado porque comprende un anticuerpo como se define en la Reivindicación 1.

10 3. Método de detección *ex vivo* de células epiteliales glandulares, células de tejido nervioso o de tejido tumoral derivadas de estos tejidos, en donde la muestra de dichas células de tejido es reconocida por un anticuerpo dirigido contra el antígeno bacteriano que comprende un motivo estructural definido por la fórmula:



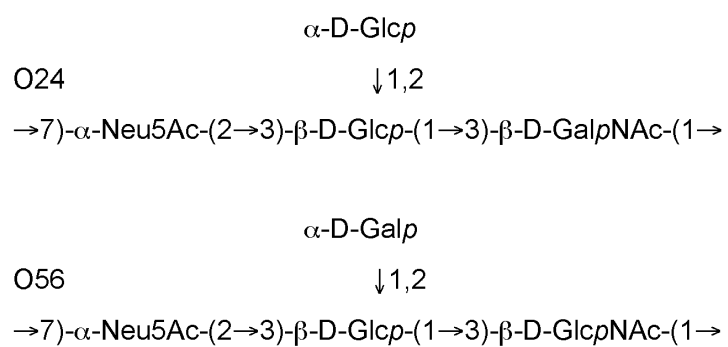


Fig. 1

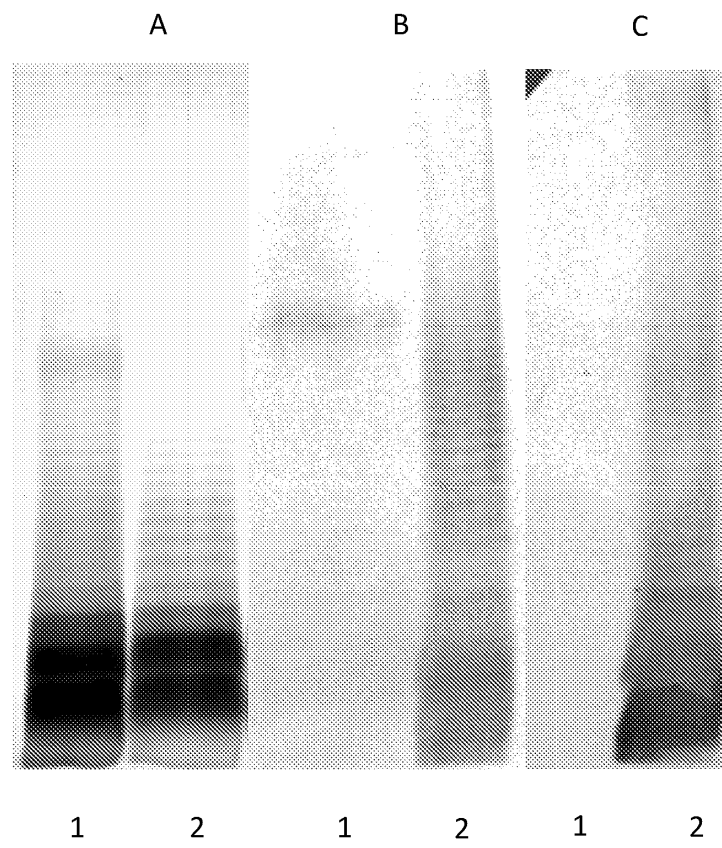


Fig. 2

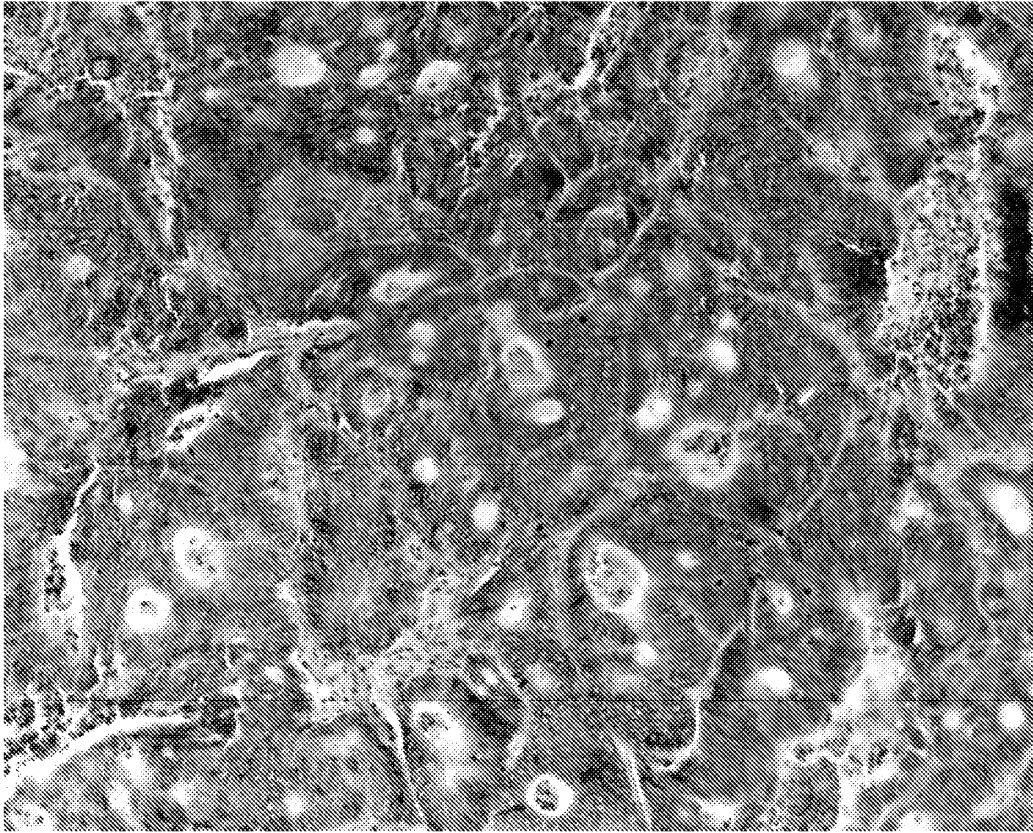


Fig. 3

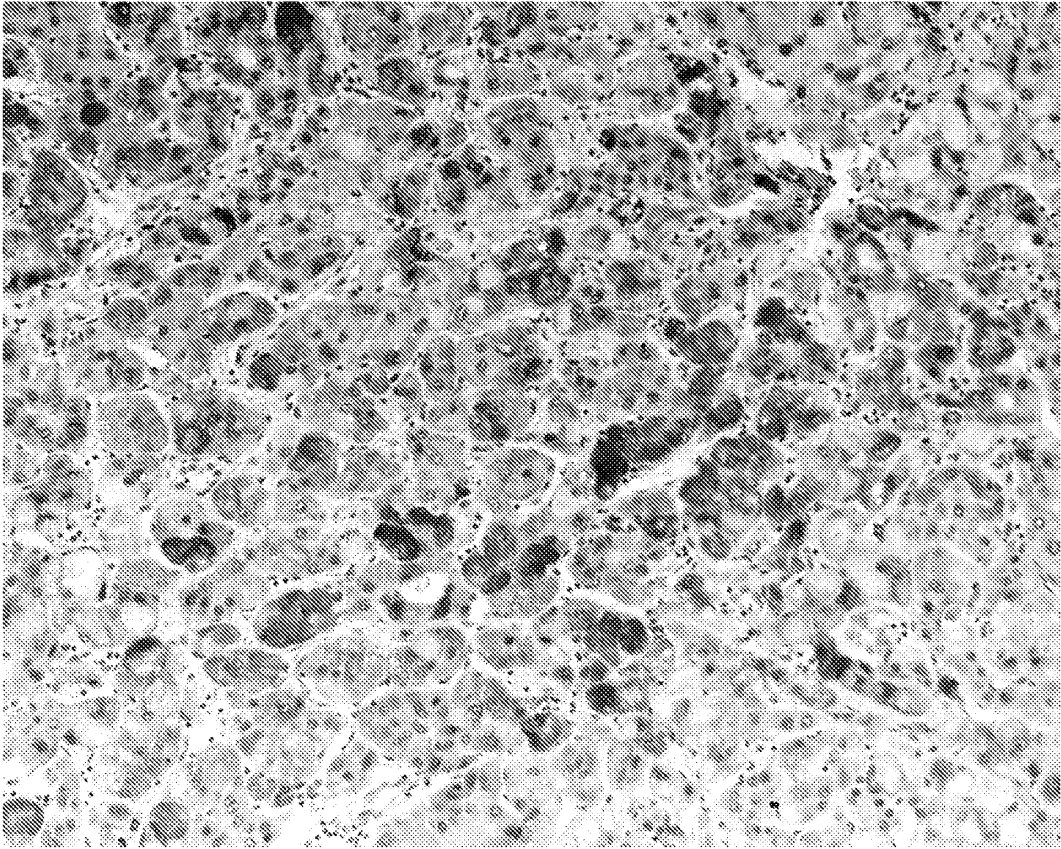


Fig. 4

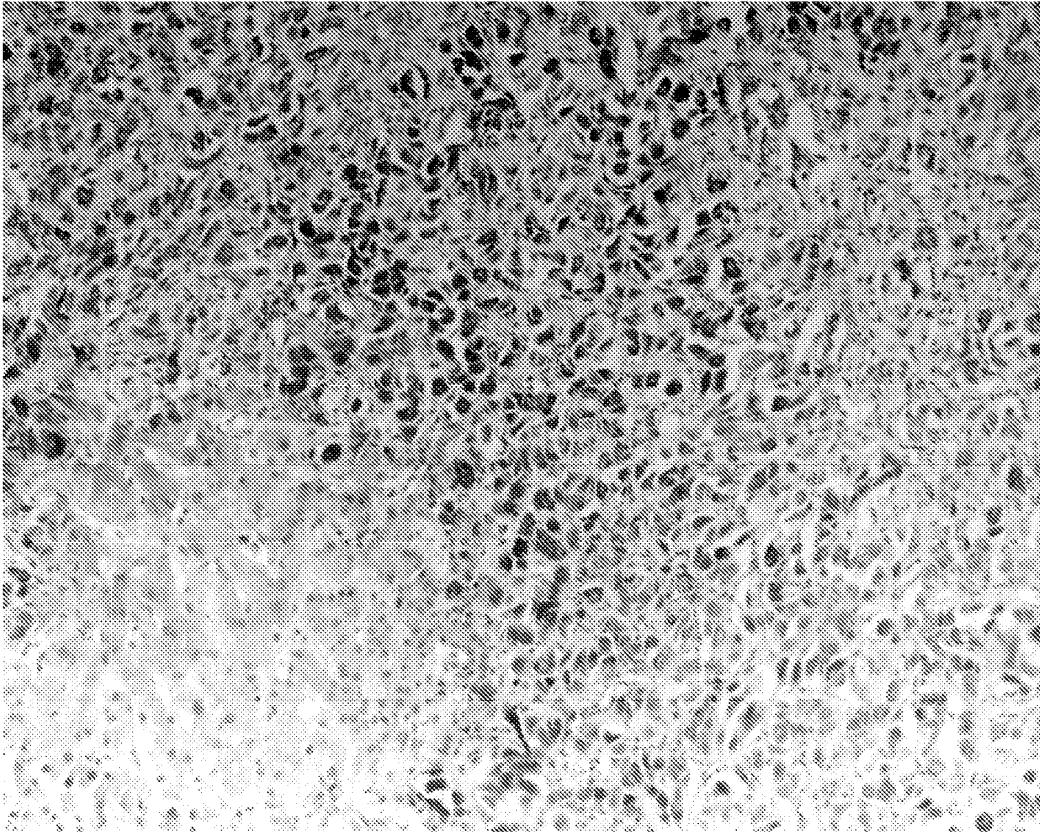


Fig. 5

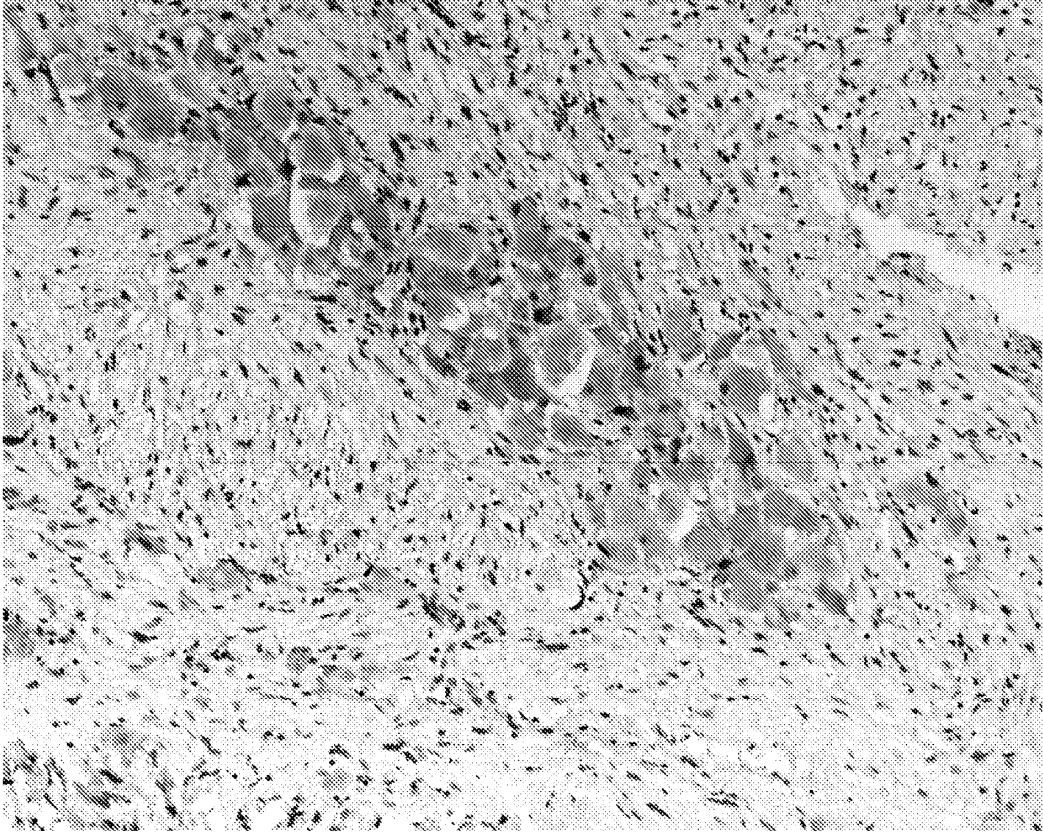


Fig. 6

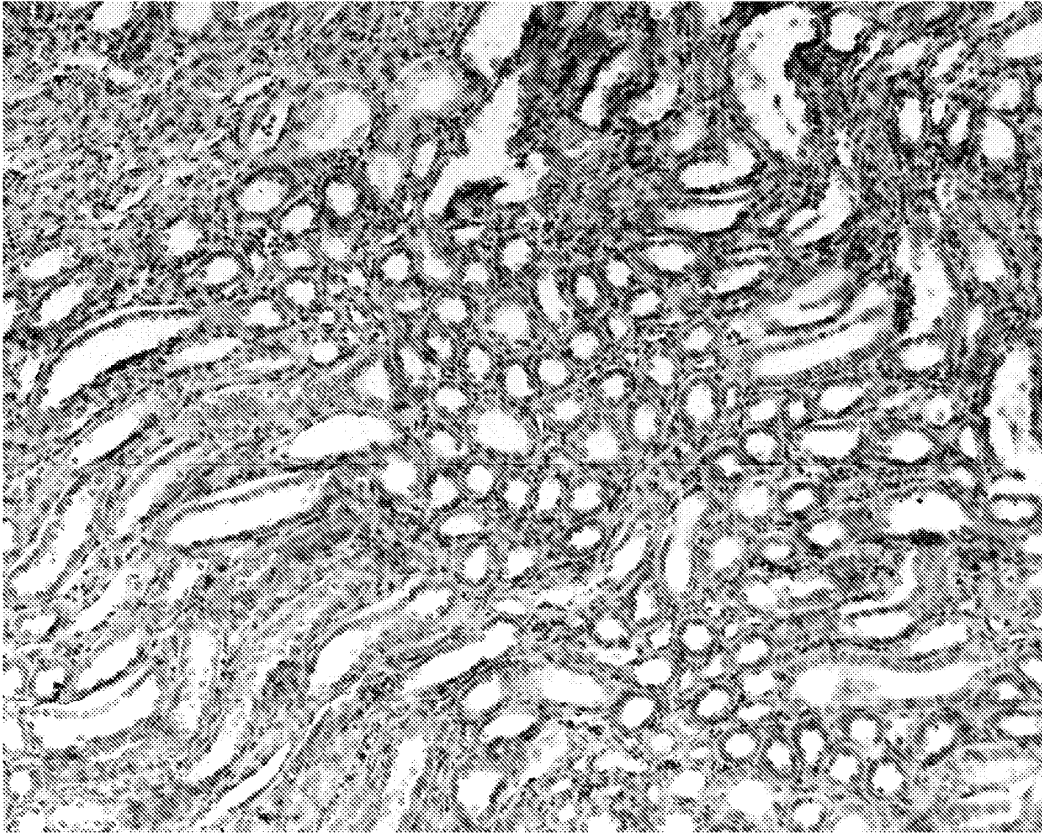


Fig. 7

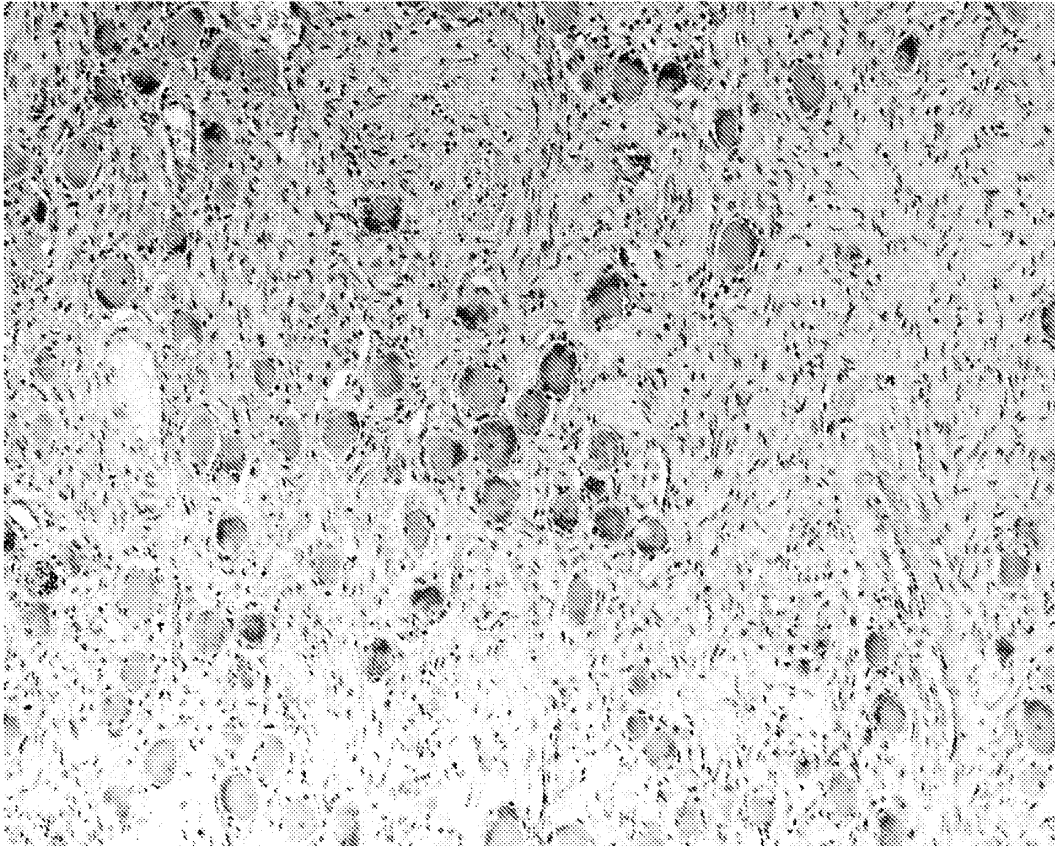


Fig. 8

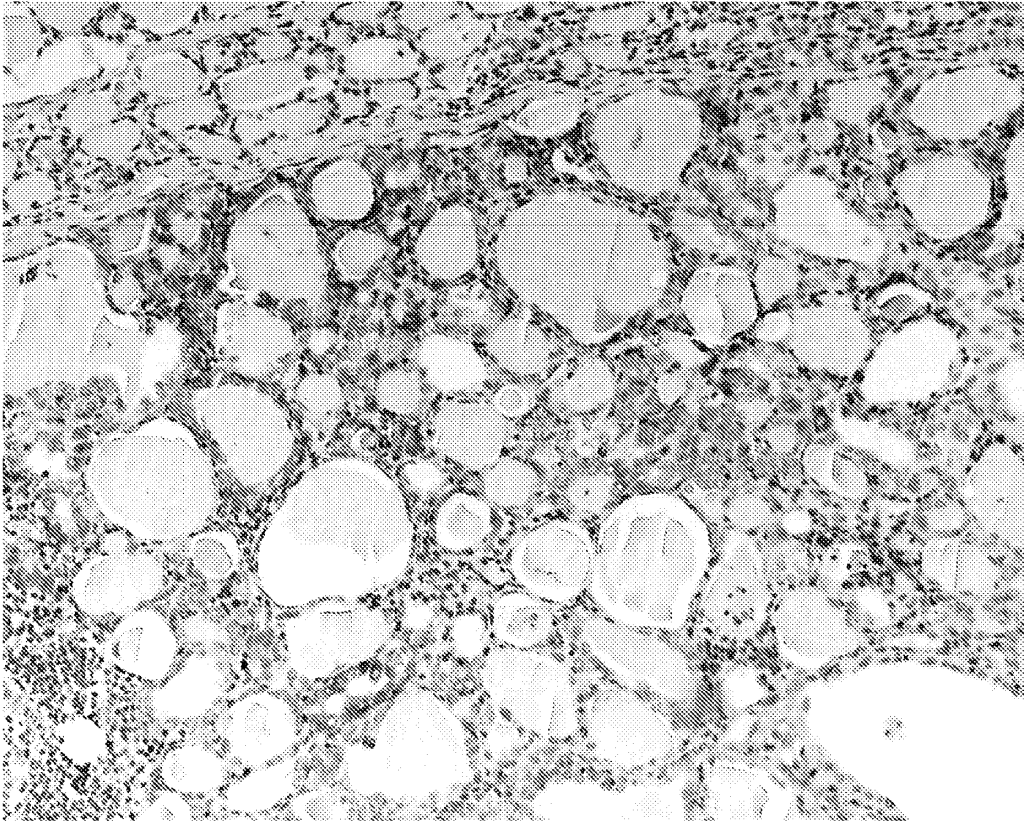


Fig. 9