

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 465**

51 Int. Cl.:

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07D 495/04 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2007 E 12150646 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2442107**

54 Título: **Haptenos, conjugados de haptenos, composiciones de los mismos y método para su preparación y uso**

30 Prioridad:

01.11.2006 US 856133 P

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

05.06.2014

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**KOSMEDER, JERRY W.;
LEFEVER, MARK;
JOHNSON, DONALD;
FARRELL, MICHAEL;
ZHILINA, ZHANNA y
BIENIARZ, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 465 465 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

Haptenos, conjugados de haptenos, composiciones de los mismos y método para su preparación y uso

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a haptenos, conjugados de haptenos y composiciones de los mismos utilizados con fines terapéuticos y de diagnóstico. Más concretamente, esta divulgación se refiere a haptenos, conjugados de haptenos y conjugados de anticuerpos anti-haptenos, que se pueden utilizar en diversas combinaciones para la identificación, visualización y/o cuantificación simultáneas de una pluralidad de dianas en una muestra, tales como múltiples dianas de ácido nucleico y proteína en una muestra de tejido.

10 Antecedentes

Por lo general, solamente las moléculas de gran tamaño, los agentes infecciosos y los objetos extraños insolubles pueden provocar una respuesta inmune en un animal. Sin embargo, en determinados casos se puede provocar que los haptenos, que son moléculas pequeñas, provoquen una respuesta inmune, si primero se unen a un vehículo de gran tamaño (como una proteína) para formar un inmunógeno. Los haptenos, en combinación con anticuerpos anti-haptenos que se activan contra los inmunógenos y se aíslan, son útiles para detectar dianas moleculares concretas. Por ejemplo, se pueden etiquetar fracciones de unión específica, como anticuerpos primarios y sondas de ácido nucleico, con una o más moléculas de hapteno, y una vez que estas fracciones de unión específica están unidas a sus dianas moleculares se pueden detectar utilizando un conjugado de anticuerpo anti-hapteno que incluye una etiqueta detectable como una enzima o una etiqueta fluorescente. La unión del conjugado de anticuerpo anti-hapteno detectable en una muestra indica la presencia de la diana en la misma.

La digoxigenina, presente exclusivamente en plantas *Digitalis* como un metabolito secundario, es un ejemplo de hapteno que se ha utilizado en diversos ensayos moleculares. La Patente estadounidense nº 4.469.797, titulada "Digoxigenin Immunogens, Antibodies, Label Conjugates and Related Derivatives," divulga el uso de inmunoensayos para determinar las concentraciones de digoxina en muestras de sangre, basándose en la unión específica de los anticuerpos anti-digoxina al fármaco en la muestra de ensayo. La Patente estadounidense nº 5.198.537, titulada "Digoxigenin Derivatives and Use Thereof," describe una serie de derivados de digoxigenina adicionales que han sido utilizados en ensayos inmunológicos, tales como inmunoensayos.

Otros haptenos se han desarrollado para procedimientos analíticos, entre los que se incluyen la biotina y la fluoresceína. No obstante, cada uno de estos haptenos presenta inconvenientes específicos que han convertido a la dioxigenina en el hapteno preferido para los inmunoensayos sensibles. En el caso de la biotina, determinadas muestras biológicas incluyen biotina endógena, lo que puede provocar una interferencia de fondo. De igual modo, la fluoresceína, una molécula fluorescente, puede provocar fluorescencia de fondo en un inmunoensayo fluorescente. Para los ensayos *in situ*, como los ensayos inmunohistoquímicos (IHC) y los ensayos de hibridación *in situ* (ISH) de muestras de tejido y citológicas, especialmente los ensayos multiplexados de estas muestras, resulta sumamente recomendable identificar y desarrollar nuevos haptenos y anticuerpos anti-haptenos (y conjugados de los mismos) para proporcionar una mayor flexibilidad al ensayo, especialmente dado que ahora resulta evidente que las muestras se pueden caracterizar mejor mediante la detección simultánea de múltiples dianas.

Un objetivo fundamental de la terapia del cáncer consiste en destruir de forma selectiva las células malignas, o inhibir su crecimiento incontrolado, aunque sin afectar negativamente a las células normales. Los fármacos quimioterapéuticos tradicionales son altamente citotóxicos y, a pesar de que preferiblemente tienen una mayor afinidad por las células malignas que por las células normales, por lo general tienen un efecto negativo sobre estas últimas. En la actualidad se están desarrollando nuevos agentes terapéuticos dirigidos a las vías de los nutrientes y del factor de crecimiento que regulan el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a estímulos intracelulares y ambientales. Estas vías de señalización a menudo se encuentran alteradas o desreguladas en el cáncer. Por ejemplo, determinados factores de crecimiento (como el EGF, un factor de crecimiento que desencadena la actividad de la proteína-receptor de tirosina quinasa (RTK) para iniciar una cascada de transducción de señales que provoca cambios en el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular) participan en la patogénesis y progresión de diferentes cánceres. Estas vías y moléculas de señalización asociadas representan dianas atractivas para la intervención terapéutica, aunque cada vez resulta más evidente que las diferentes poblaciones de pacientes presentan tumores que parecen estar desregulados de diferentes maneras. Por ejemplo, una diana terapéutica concreta (o una combinación de dianas terapéuticas) puede estar presente solamente en los tumores de determinadas poblaciones de pacientes y, por tanto, la identificación de estas poblaciones que presentan la diana (o una combinación de dianas) se puede utilizar para clasificar a los pacientes como potenciales respondedores o potenciales no respondedores a un agente terapéutico (o a una combinación de terapéuticos) dirigido contra la diana (o dianas). El uso de diagnósticos complementarios para clasificar a los pacientes de esta manera es un primer paso para personalizar el tratamiento del cáncer en los pacientes individuales. Una mayor individualización de los tratamientos implicará indudablemente ensayos multiplexados para múltiples dianas terapéuticas.

WO 95/03296A1 divulga sustancias intermedias de hapteno unidas y conjugados relacionados a base de carbazol y/o dibenzofurano.

Anónimo: "Polyclonal Anti-Conjugated Rotenene Antibodies (rat)", Hoja de datos AP115, 5 de abril de 2006, recuperado de Internet:

URL: http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/GEM_/AP115.20060405.pdf, divulga rotenona sintética conjugada con vehiculos de proteína.

5 Lamentablemente, en los últimos años se han realizado muy pocas investigaciones dirigidas al desarrollo de otras clases de haptenos contra las que se puedan activar anticuerpos sensibles y específicos, para poder realizar ensayos altamente multiplexados. Estos ensayos altamente multiplexados serían útiles para controlar la respuesta de los individuos a un determinado régimen terapéutico y para las aplicaciones de diagnóstico relacionadas. La identificación de clases adicionales de haptenos y métodos para su uso en aplicaciones analíticas y terapéuticas representaría un importante avance de la técnica en este campo.

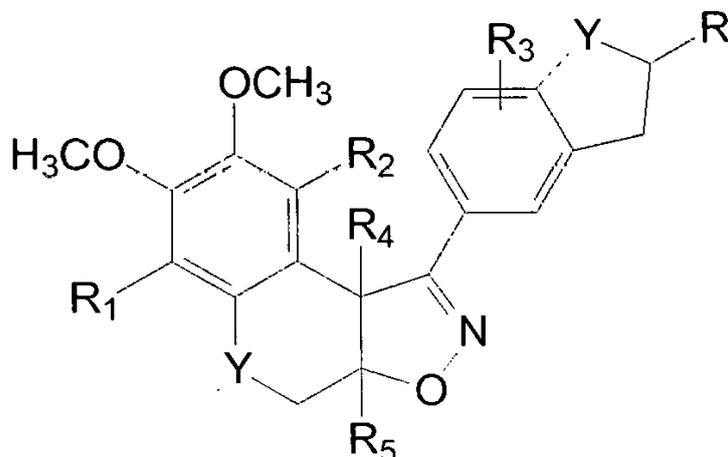
Resumen

15 Por tanto, debido a lo anteriormente expuesto, la técnica precisa de haptenos y conjugados de haptenos adicionales, que sean útiles para el diagnóstico y/o aplicaciones terapéuticas. Por consiguiente, determinadas realizaciones divulgadas de la presente invención se refieren a nuevas clases de haptenos, conjugados de haptenos y composiciones de los mismos.

La presente invención se define en las reivindicaciones

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar dos o más dianas en una muestra que consiste en:

20 poner en contacto la muestra con dos o más fracciones de unión específica que se unen específicamente a dos o más dianas diferentes, donde las dos o más fracciones de unión específica se conjugan con diferentes haptenos, siendo al menos uno de ellos una primera isoxazolina de rotenona con la fórmula:



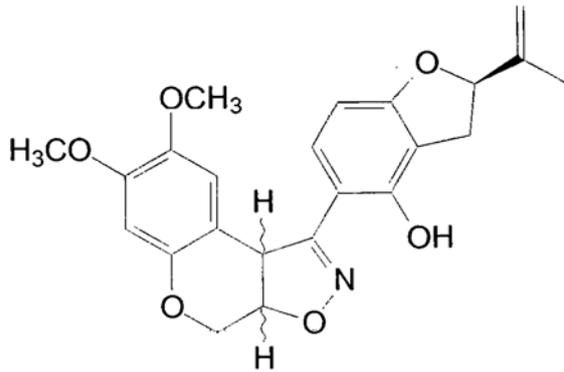
25 donde R-R₅ son independientemente hidrógeno, aldehído, alcoxi, alifático, alifático sustituido, heteroalifático, amino, aminoácido, amido, ciano (-CN), halógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima, éter de oxima, alquilo hidroxilo, cetona, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfoxida, carboxilo, carboxilato, éster, éster de alquilo, acilo, exometileno, éter, cíclico, heterocíclico, arilo, alquilo arilo, heteroarilo, carbohidrato, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y combinaciones de los mismos, Y es oxígeno, una amina, o sulfuro y al menos uno de los sustituyentes R-R₅ está unido a un conector o una molécula portadora, siendo el otro hapteno un oxazol, un pirazol, un tiazol, un benzofurazano, un triterpeno, una urea, una tiourea, un nitroarilo distinto de dinitrofenilo, una segunda isoxazolina de rotenona diferente de la primera isoxazolina de rotenona, una cumarina, un ciclolignano, un heterobiarilo, un azoarilo o una benzodiazepina;

35 poner en contacto la muestra con dos o más anticuerpos anti-hapteno diferentes que se pueden detectar por separado; y

detectar los anticuerpos anti-hapteno.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona un método para detectar una diana en una muestra, que consiste en:

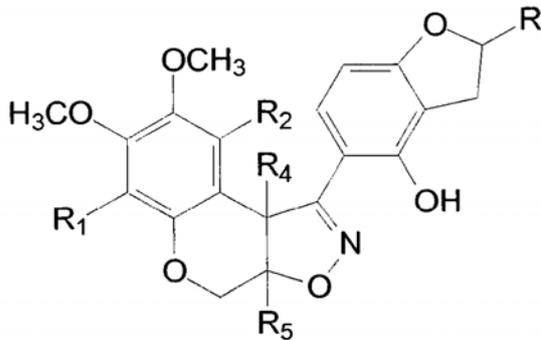
40 poner en contacto la muestra con una fracción de unión específica que se une específicamente a una diana, conjugándose la fracción de unión específica con un hapteno de isoxazolina de rotenona con la fórmula



poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente al hapteno de isoxazolina de rotenona; y detectar el anticuerpo que se une específicamente al hapteno de isoxazolina de rotenona.

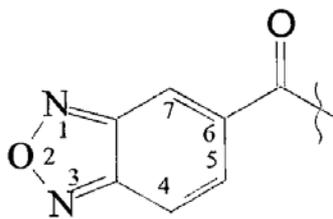
Preferiblemente, donde la primera isoxazolina de rotenona tiene la fórmula

5



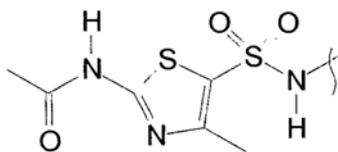
donde R-R₂ y R₄-R₅ son independientemente alifático, alcoxi, alquilo hidroxilo, hidrógeno o hidroxilo.

Más preferiblemente, donde el otro hapteno es

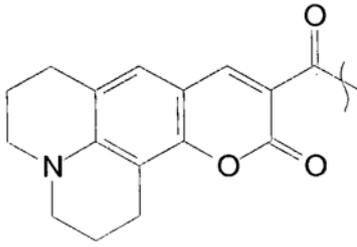


10

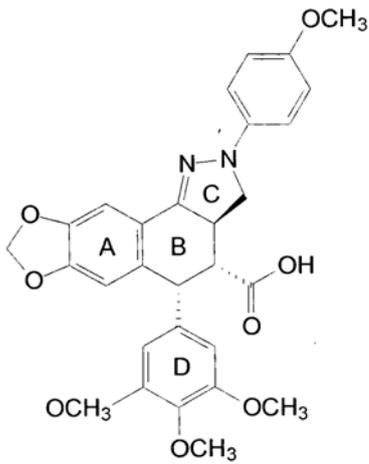
y/o, donde el otro hapteno es



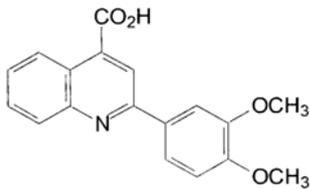
y/o, el otro hapteno es



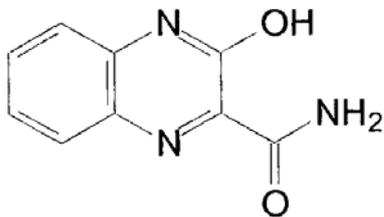
y/o, el otro hapteno es



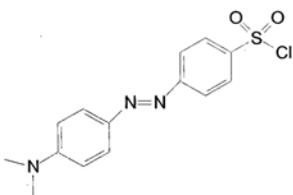
5 y/o, el otro hapteno es



y/o, el otro hapteno es

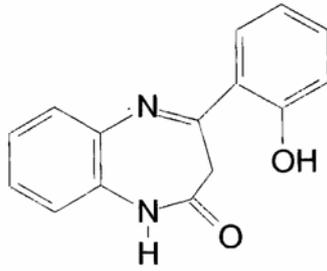


y/o, el otro hapteno es



10

y/o, el otro hapteno es



Ventajosamente, donde R-R₅ es independientemente alifático, alifático sustituido, hidrógeno o hidroxilo.

Preferiblemente, donde Y es oxígeno.

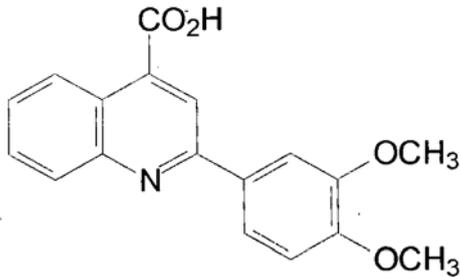
- 5 Más preferiblemente, donde R-R₅ es independientemente hidrógeno o hidroxilo, e Y es oxígeno.

Ventajosamente, donde Y es -NH:

Preferiblemente, consiste además en:

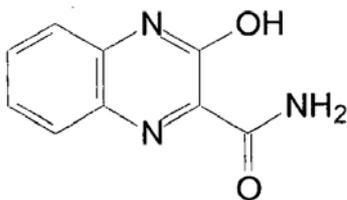
poner en contacto la muestra con una segunda fracción de unión específica que se une específicamente a una segunda diana diferente en la muestra,

- 10 conjugándose la segunda fracción de unión específica con un hapteno de heteroarilo que tiene una estructura química



o bien

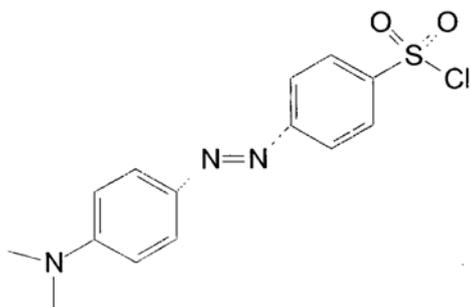
- 15 conjugándose la segunda fracción de unión específica con un hapteno de heteroarilo que tiene una estructura química



o bien

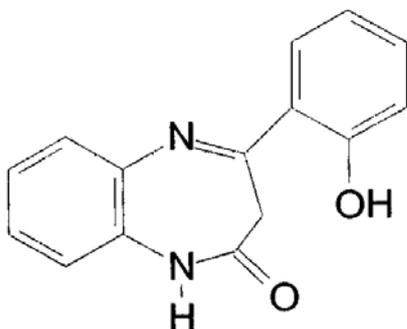
conjugándose la segunda fracción de unión específica con un hapteno de azoarilo que tiene una estructura química

20



o bien

5 conjugándose la segunda fracción de unión específica con un hapteno de benzodiazepina que tiene una estructura química



poner en contacto la muestra con un segundo anticuerpo que se une específicamente al hapteno de heteroarilo; y

10 detectar el segundo anticuerpo que se une específicamente al hapteno de heteroarilo por separado del anticuerpo que se une específicamente al hapteno de isoxazolina de rotenona.

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la invención resultarán más evidentes con la siguiente descripción detallada, que se desarrolla con referencia a las figuras adjuntas

Breve descripción de las ilustraciones

15 La FIG. 1 es una ilustración esquemática que representa una realización de un proceso de hibridación in situ multiplexado.

La FIG. 2 es una ilustración esquemática que representa una realización de un método para utilizar enzimas como fracciones generadoras de señales.

La FIG. 3 es una ilustración esquemática que representa la detección directa de una diana utilizando un anticuerpo primario que comprende una etiqueta que genera una señal detectable.

20 La FIG. 4 es un diagrama esquemático que representa una realización de un método para amplificar las señales de detección.

La FIG. 5 es una ilustración esquemática que representa una realización de la detección inmunohistoquímica de nanocristales semiconductores fluorescentes (o quantum dots), de conformidad con la presente divulgación.

25 La FIG. 6 es una fotomicrografía que ilustra la tinción positiva IHC de la detección del anticuerpo anti-hapteno utilizando un anticuerpo primario conjugado con una realización divulgada de una clase de haptenos, de conformidad con la presente divulgación.

La FIG. 7 es una fotomicrografía que ilustra la tinción negativa IHC utilizando un anticuerpo anti-hapteno, mediante el uso de un anticuerpo primario conjugado con una realización divulgada de una clase de haptenos, de conformidad con la presente divulgación.

30 La FIG. 8 es un diagrama esquemático que representa una realización de un método divulgado para la detección multiplexada de múltiples dianas en una muestra utilizando una pluralidad de haptenos diferentes y una pluralidad de fracciones diferentes generadoras de señales para generar una pluralidad de señales detectables diferentes.

- La FIG. 9 es una micrografía realizada utilizando múltiples haptenos y anticuerpos para ello, como anti-biotina y anti-dinitrofenilo, para la detección de una muestra, como proteína, en un tejido.
- La FIG. 10 representa esquemáticamente una realización de la detección multiplexada de dos clases diferentes de dianas, concretamente un gen y una proteína diana.
- 5 La FIG. 11 es una fotomicrografía que ilustra la detección de proteína y 2 genes, por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-dinitrofenilo.
- La FIG. 12 ilustra los resultados de un ensayo ELISA del producto de la fusión de hibridoma para anticuerpos monoclonales de IgG de ratón contra una realización de un hapteno de benzofurazano divulgado.
- 10 La FIG. 13 ilustra los resultados de un ensayo ELISA del producto de la fusión de hibridoma para anticuerpos monoclonales de IgG de ratón contra una realización de un hapteno de benzofurazano divulgado.
- La FIG. 14 ilustra los resultados de un ensayo ELISA del producto de la fusión de hibridoma para anticuerpos monoclonales de IgG de ratón contra una realización de un hapteno de benzofurazano divulgado.
- La FIG. 15 ilustra los resultados de un ensayo ELISA del producto de la fusión de hibridoma para anticuerpos monoclonales de IgG de ratón contra una realización de un hapteno de benzofurazano divulgado.
- 15 La FIG. 16 ilustra los resultados de un ensayo ELISA del producto de la fusión de hibridoma para anticuerpos monoclonales de IgG de ratón contra una realización de un hapteno de benzofurazano divulgado.
- La FIG. 17 es un gráfico del porcentaje de nucleótico frente a la concentración de DNP.
- La FIG. 18 es un gráfico de la concentración de ADN de salmón sobre el porcentaje de nucleótido etiquetado.
- 20 La FIG. 19 es una tinción IHC cromogénica de anticuerpos primarios CD20 etiquetados con biotina con conjugados de HRP anti-biotina sobre tejido de amígdala normal.
- La FIG. 20 es una tinción IHC cromogénica de anticuerpos primarios CD45 etiquetados con un hapteno basado en tiazol sulfonamida con conjugados de HRP anti-tiazol sulfonamida sobre tejido de amígdala normal.
- La FIG. 21 es una tinción IHC cromogénica de anticuerpos primarios Ki-67 etiquetados con un hapteno basado en benzofurazano con conjugados de HRP anti-benzofurazano sobre tejido de amígdala normal.
- 25 La FIG. 22 es una tinción IHC cromogénica de anticuerpos primarios CD34 etiquetados con un hapteno basado en nitropirazol con conjugados de HRP anti-nitropirazol sobre tejido de amígdala normal.
- La FIG. 23 es una tinción IHC cromogénica de anticuerpos primarios Kappa etiquetados con un hapteno basado en dinitrofenilo con conjugados de HRP anti-dinitrofenilo sobre tejido de amígdala normal.
- 30 La FIG. 24 es una tinción IHC cromogénica de anticuerpos primarios Lambda etiquetados con un hapteno basado en rotenona con conjugados de HRP anti-rotenona sobre tejido de amígdala normal.
- La FIG. 25 es una tinción IHC fluorescente de tejido de amígdala normal utilizando anti-lambda unido a biotina y detectado con un conjugado QDot de anticuerpo anti-biotina.
- La FIG. 26 es una tinción IHC fluorescente en tejido de amígdala normal utilizando anti-lambda unido a un hapteno basado en tiazol sulfonamida y detectado con un conjugado QDdot de anticuerpo anti-tiazol sulfonamida.
- 35 La FIG. 27 es una tinción IHC fluorescente en tejido de amígdala normal utilizando anti-lambda unido a un hapteno basado en benzofurazano y detectado con un conjugado QDdot de anticuerpo anti-benzofurazano.
- La FIG. 28 es una tinción IHC fluorescente en tejido de amígdala normal utilizando anti-lambda unido a un hapteno basado en dinitrofenilo y detectado con un conjugado QDdot de anticuerpo anti-dinitrofenilo.
- 40 La FIG. 29 es una tinción IHC fluorescente en tejido de amígdala normal utilizando anti-lambda unido a un hapteno basado en nitropirazol y detectado con un conjugado QDdot de anticuerpo anti-nitropirazol.
- La FIG. 30 es una tinción IHC fluorescente en tejido de amígdala normal utilizando anti-lambda unido a un hapteno basado en rotenona y detectado con un conjugado QDdot de anticuerpo anti-rotenona.
- La FIG. 31 es una tinción IHC fluorescente de anticuerpos primarios CD20 etiquetados con biotina con un conjugado QDot 525 anti-biotina sobre tejido de amígdala normal.
- 45 La FIG. 32 es una tinción IHC fluorescente de anticuerpos primarios CD45 etiquetados con un hapteno basado en tiazol sulfonamida con un conjugado Qdot 565 de anticuerpos anti-tiazol sulfonamida sobre tejido de amígdala normal.
- La FIG. 33 es una tinción IHC fluorescente de anticuerpos primarios Ki67 etiquetados con un hapteno basado en benzofurazano con un conjugado Qdot 585 de anticuerpos anti-benzofurazano sobre tejido de amígdala normal.
- 50 La FIG. 34 es una tinción IHC fluorescente de anticuerpos primarios Kappa etiquetados con un hapteno basado en dinitrofenilo con un conjugado Qdot 605 de anticuerpos anti-dinitrofenilo sobre tejido de amígdala normal.

La FIG. 35 es una tinción IHC fluorescente de anticuerpos primarios CD34 etiquetados con un hapteno basado en nitropirazol con un conjugado Qdot 655 de anticuerpos anti-nitropirazol sobre tejido de amígdala normal.

La FIG. 36 es una tinción IHC fluorescente de anticuerpos primarios Lambda etiquetados con un hapteno basado en rotenona con un conjugado Qdot 705 de anticuerpos anti-rotenona sobre tejido de amígdala normal.

5 La FIG. 37 es un compuesto de tinción multiplexado utilizando una mezcla de los conjugados de anticuerpo primario-hapteno y visualizado secuencialmente con una mezcla de conjugados QDot de anticuerpos anti-hapteno sobre tejido de amígdala normal, tal como se indica en las FIG. 31-36 y en el Ejemplo 34.

La FIG. 38 es una imagen extraída de un compuesto de tinción multiplexado que representa un conjugado de tiazol sulfonamida anti-CD45 y un conjugado Qdot 565 de anticuerpos anti-tiazol sulfonamida y anticuerpos primarios de hapteno sobre tejido de amígdala normal.

10 La FIG. 39 es una imagen extraída de un compuesto de tinción multiplexado de la FIG. 37 que representa la tinción del conjugado de benzofurazano anti-Ki67 y un conjugado QDotOT 585 de anticuerpos anti-benzofurazano y anticuerpos primarios de hapteno sobre tejido de amígdala normal.

La FIG. 40 es una imagen extraída de un compuesto de tinción multiplexado de la FIG. 37 que representa un conjugado de dinitrofenilo anti-Kappa y un conjugado QDot 605 de anticuerpos de hapteno anti-dinitrofenilo y anticuerpos primarios de hapteno sobre tejido de amígdala normal.

La FIG. 41 es una imagen extraída de un compuesto de tinción multiplexado de la FIG. 37 que representa un conjugado de nitropirazol anti-CD34 y un conjugado QDot 655 de anticuerpos de hapteno anti-nitropirazol y anticuerpos primarios de hapteno sobre tejido de amígdala normal.

20 La FIG. 42 es una imagen extraída de un compuesto de tinción multiplexado de la FIG. 37 con conjugado QDot 525 de anticuerpos primarios de biotina anti-CD20 sobre tejido de amígdala normal.

La FIG. 43 es una imagen extraída de un compuesto de tinción multiplexado de la FIG. 37 que representa un conjugado de rotenona anti-Lambda y un conjugado QDot 705 de anticuerpos de hapteno anti-rotenona y anticuerpos primarios de hapteno sobre tejido de amígdala normal.

25 La FIG. 44 es un gráfico de la longitud de onda frente a la fluorescencia relativa que representa las longitudes de onda utilizadas para obtener señales QDot individuales del compuesto de tinción multiplexado de la FIG. 37 y muestra que la señal es superior a la autofluorescencia nominal del tejido de amígdala.

Descripción detallada

30 I. Términos e introducción

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan con arreglo al uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, Genes VII, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicada por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares.

40 Para los fines del presente, los términos en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los correspondientes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, el término "o" incluye "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Asimismo, para los fines del presente, el término "comprende" significa "incluye". Por tanto, "comprende A o B" significa "incluye A, B o A y B". También se entenderá que los tamaños de todos los nucleótidos o aminoácidos, así como todos los pesos moleculares o valores de masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos u otros compuestos son aproximados y se proporcionan únicamente para los fines de la descripción. A pesar de que para la práctica o ensayo de la presente divulgación se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en el presente se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las explicaciones de los términos. Por otra parte, los materiales, métodos y ejemplos se ofrecen únicamente a título ilustrativo y no pretenden tener un carácter limitador.

50 A fin de facilitar la revisión de los diversos ejemplos de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos concretos:

Adyuvante: Una sustancia que potencia de forma no específica la respuesta inmune a un antígeno. El desarrollo de adyuvantes para vacunas para su uso en seres humanos se revisa en Singh et al. (Nat. Biotechnol. 17:1075-1081, 1999), que divulga que, en el momento de su publicación, las sales de aluminio, como el hidróxido de aluminio (Amphogel, Wyeth Laboratories, Madison, NJ), y la microemulsión de MF59 son los únicos adyuvantes para vacunas aprobados para su uso en seres humanos. Un hidrogel de aluminio (comercializado por Brentg Biosector, Copenhagen, Dinamarca) es otro adyuvante habitual.

En una realización, un adyuvante incluye un motivo de ADN que estimula la activación inmunitaria, por ejemplo la respuesta inmune innata o la respuesta inmune adaptativa de los linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas y linfocitos T citotóxicos. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, de motivos de ADN que estimulan la activación inmunitaria incluyen los oligodesoxinucleótidos CpG, tal como se describen en las Patentes estadounidenses nº 6.194.388 ; 6.207.646 ; 6.214.806 ; 6.218.371 ; 6.239.116 ; 6.339.068 ; 6.406.705 ; y 6.429.199 .

Amplificación: Determinadas realizaciones de la presente divulgación permiten la detección de una única diana utilizando una pluralidad de complejos de visualización, donde los complejos pueden ser iguales o diferentes, para facilitar la identificación y/o cuantificación de una diana concreta.

Análogo, derivado o mimético: Un análogo es una molécula que difiere en estructura química de un compuesto de origen, por ejemplo, un homólogo (que difiere en un incremento en la estructura química, como una diferencia en la longitud de una cadena alquímica), un fragmento molecular, una estructura que difiere en uno o más grupos funcionales, un cambio en la ionización. A menudo se encuentran análogos estructurales utilizando relaciones cuantitativas de actividad estructural (QSAR), con técnicas como las que se divulgan en Remington (The Science and Practice of Pharmacology, 19 edición (1995), capítulo 28). Un derivado es una molécula biológicamente activa derivada de la estructura de base. Un mimético es una molécula que imita la actividad de otra molécula, como una molécula biológicamente activa. Las moléculas biológicamente activas pueden incluir estructuras químicas que imitan la actividad biológica de un compuesto.

Animal: Organismos vertebrados pluricelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye tanto mamíferos humanos como no humanos. Asimismo, el término "sujeto" incluye tanto sujetos humanos como veterinarios, por ejemplo, los seres humanos, los primates no humanos, perros, gatos, caballos y vacas.

Anticuerpo: "Anticuerpo" se refiere colectivamente a inmunoglobulinas o moléculas similares a inmunoglobulinas (incluyendo, a título meramente enunciativo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmune en cualquier vertebrado, por ejemplo en mamíferos, como seres humanos, cabras, conejos y ratones) y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés muy similares), con la exclusión importante de la unión a otras moléculas (como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen una constante de unión para la molécula de interés al menos 10^3 M^{-1} superior, al menos 10^4 M^{-1} superior o al menos 10^5 M^{-1} superior a la constante de unión para otras moléculas presentes en una muestra biológica).

Más concretamente, "anticuerpo" se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une específicamente al epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una cadena ligera, y cada una de ellas tiene una región variable, denominadas región variable pesada (V_H) y región variable ligera (V_L). Juntas, la región V_H y la región V_L son responsables de unirse al antígeno reconocido por el anticuerpo.

Esto incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de las mismas, bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de anticuerpos proteolíticos [tales como fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab' , fragmentos Fab' -SH y fragmentos Fab bien conocidos en la técnica], fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsfv, fragmentos biespecíficos sFv, fragmentos biespecíficos dsfv, fragmentos $F(ab)_2$, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (bien conocidos en la técnica) y anticuerpos camélidos (véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses nº 6.015.695; 6.005.079 - 5.874.541; 5.840.526; 5.800.988 ; y 5.759.808). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un conector, mientras que en las dsFvs, las cadenas han sido mutadas para introducir un enlace de disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término incluye asimismo formas modificadas genéticamente, como los anticuerpos quiméricos (como anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (como anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog y Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Típicamente, una inmunoglobulina naturalmente presente tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas a través de enlaces de disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera: lambda y kappa. Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de la molécula de un anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se denominan "dominios"). Combinadas, las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Se ha definido el alcance de la región marco y las CDR (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, 1991 , que se incorpora al presente como referencia). La base de datos de Kabat ahora se mantiene online. Las secuencias de las regiones marco de las diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente

dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, que son las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas que lo componen, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N-terminal, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se encuentra la CDR concreta. Por tanto, una CDR3 de V_H se encuentra en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo que se une al RET tendrá una región V_H específica y la secuencia de la región V_L y, por tanto, secuencias de CDR específicas. Los anticuerpos con especificidades diferentes (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen CDR diferentes. A pesar de que son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solamente una cantidad limitada de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR participan directamente en la unión del antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de la especificidad (SDR).

Antígeno: Un compuesto, una composición o sustancia al que se pueden unir específicamente los productos de inmunidad celular o humoral específica, como la molécula de un anticuerpo o un receptor de linfocitos T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermediarios simples, azúcares (p.ej., oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas, tales como carbohidratos complejos (p.ej., polisacáridos), fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Algunas categorías habituales de antígenos incluyen, a título meramente enunciativo, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, protozoos y otros antígenos parasitarios, antígenos tumorales, antígenos implicados en una enfermedad autoinmune, alergias y rechazos de injertos, toxinas, y otros antígenos diversos. En un ejemplo, un antígeno es un antígeno de Bacillus, como γ PGA.

Avidina: Cualquier tipo de proteína que se une específicamente a la biotina, con una exclusión importante de otras moléculas pequeñas que podrían encontrarse presentes en una muestra biológica. Algunos ejemplos de avidina incluyen las avidinas que se encuentran naturalmente presentes en la clara de huevo, la proteína de las semillas oleaginosas (p.ej., alimentos de soja) y cereales (p.ej., maíz) y la estreptavidina, que es una proteína de origen bacteriano.

Afinidad de unión: La tendencia de una molécula a unirse (típicamente de forma no covalente) con otra molécula, como la tendencia de un miembro de un par de unión específica al otro miembro de un par de unión específica. La afinidad de unión se puede medir como una constante de unión, pudiendo ser esta afinidad de unión para un par de unión específica (como un par de anticuerpo/antígeno o un par de sonda de ácido nucleico/ácido nucleico) al menos de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, como al menos de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, al menos de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ o al menos de $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. En una realización, se calcula la afinidad de unión mediante una modificación del método de Scatchard descrito por Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106, 1979. En otra realización, la afinidad de unión se mide a través de un índice de disociación antígeno/anticuerpo. En otra realización más, una afinidad de unión elevada se mide a través de un radioinmunoensayo de competencia. En varios ejemplos, una afinidad de unión elevada para un par anticuerpo/antígeno es al menos aproximadamente de $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. En otras realizaciones, una afinidad de unión elevada es al menos aproximadamente de $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente de $2,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente de $2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente de $3,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente de $3,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente de $4,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente de $4,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, o al menos aproximadamente de $5,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Vehículo: Una molécula a la que se puede unir un hapteno o un antígeno. Entre las moléculas vehículo se incluyen vehículos inmunogénicos y vehículos de unión específica. Cuando se une a un vehículo inmunogénico, la molécula unida puede ser inmunogénica. Los vehículos inmunogénicos se pueden seleccionar para incrementar la inmunogenicidad de la molécula unida y/o para activar los anticuerpos contra el vehículo, lo que resulta beneficioso desde el punto de vista del diagnóstico, analítico y/o terapéutico. La unión covalente de una molécula a un vehículo puede conferir una inmunogenicidad potenciada y dependencia de linfocitos T (Pozsgay et al., PNAS 96:5194-97, 1999; Lee et al., J. Immunol. 116:1711-18, 1976; Dintzis et al., PNAS 73:3671-75, 1976). Entre los vehículos útiles se incluyen vehículos poliméricos, que pueden ser materiales naturales (por ejemplo, proteínas de bacterias o virus), semisintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales a los que se puede unir una fracción reactiva. Los vehículos de unión específica se pueden unir a cualquier tipo de fracción de unión específica, incluyendo un anticuerpo, un ácido nucleico, una avidina, un ácido nucleico-proteína.

Algunos ejemplos de vehículos inmunogénicos apropiados son aquellos que pueden incrementar la inmunogenicidad de un hapteno y/o contribuir a activar los anticuerpos contra el hapteno, lo que resulta beneficioso desde el punto de vista del diagnóstico, analítico y/o terapéutico. Entre los vehículos útiles se incluyen vehículos poliméricos, que pueden ser naturales (como proteínas como ovoalbúmina o hemocianina de lapa californiana) u obtenerse de un polímero natural aislado de cualquier organismo (incluyendo virus), materiales semisintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales, por ejemplo grupos amino primarios y/o secundarios, grupos azido, grupos hidroxilo o grupos carboxilo a los que se puede unir una fracción reactiva. El vehículo puede ser soluble o insoluble en agua y en algunas realizaciones es una proteína o un polipéptido. Por lo general, los vehículos que satisfacen estos criterios son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Fattom et al., Infect. Immun. 58:2309-12, 1990; Devi

et al., PNAS 88:7175-79, 1991 ; Szu et al., Infect. Immun. 59:4555-61, 1991 ; Szu et al., J. Exp. Med. 166:1510-24, 1987 ; y Pavliakova et al., Infect. Immun. 68:2161-66, 2000).

El vehículo inmunogénico puede ser un polipéptido, como un polipéptido de un rotavirus o de otro virus que no sea un rotavirus. Una lista, a título meramente enunciativo y ni mucho menos exhaustiva, de estos otros virus incluye virus adenoasociados, adenovirus, virus de la bronquitis infecciosa aviar, baculovirus, varicela, coronavirus, citomegalovirus, virus del moquillo, enterovirus, virus de Epstein Barr, virus de la leucemia felina, flavivirus, virus de la fiebre aftosa, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis E, especies de Herpes, herpes simple, virus de la gripe, VIH-1, VIH-2, HTLV 1, gripe A y B, virus Kunjin, virus de la fiebre de Lassa, LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica), lentivirus, virus del sarampión, mengovirus, morbillivirus, mixovirus, virus del papiloma, parovirus, virus paragripal, paramixovirus, parvovirus, virus M'Poko, virus de la polio, polioma virus, virus de la pseudorabia, virus de la rabia, reovirus, virus sincitial respiratorio, retrovirus, rinovirus, virus de la peste bovina, rotavirus, virus de los bosques de Semliki, virus Sendai, virus del simio 40, virus Sindbis, SV5, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, togavirus (rubeola, fiebre amarilla, dengue), Vaccinia virus, encefalomielitis equina venezolana, virus de la estomatitis vesicular, metaneumovirus, norovirus, virus SARS, virus de la viruela, picornavirus, virus varicela-zóster y virus del Nilo Occidental.

Alternativamente, el polipéptido del vehículo inmunogénico puede ser el de una bacteria u otro organismo patógeno. Entre los ejemplos de polipéptidos bacterianos se incluyen los de *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, preferiblemente *A. anitratus*, *A. haemolyticus*, *A. alcaligenes*, y *A. lwoffii*, *Actinomyces israelii*, *Aeromonas hydrophilia*, especies de *Alcaligenes*, preferiblemente *A. faecalis*, *A. odorans* y *A. denitrificans*, *Arizona hinshawii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, especies de *Brucella*, preferiblemente *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. canis*, *Calymatobacterium granulomatis*, *Campylobacter coli* (p.Ej., el polipéptido CjaA), *Campylobacter fetus* ssp. *intestinalis*, *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*, especies de *Chlamydia*, preferiblemente *C. psittaci* y *C. trachomatis*, *Chromobacterium violaceum*, especies de *Citrobacter*, preferiblemente *C. freundii* y *C. diversus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium*, preferiblemente *C. ulcerans*, *C. haemolyticum* y *C. pseudotuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Edwardsiella tarda*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacter*, preferiblemente *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. hafniae* (también denominada *Hafnia alvei*) y *E. agglomerans*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Helicobacter* (p.ej., el polipeptido UreB de *H. pylori*), especies de *Klebsiella*, preferiblemente *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* og *K. rhinoscleromatis*, especies de *Legionella*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Moraxella*, preferiblemente *M. lacunata* y *M. osloensis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* (p.ej., el polipéptido CFP10), especies de *Mycoplasma*, preferiblemente *M. pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, especies de *Nocardia*, preferiblemente *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Peptococcus magnus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pneumococci*, especies de *Proteus*, preferiblemente *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri* y *P. morgani* (también denominadas *Providencia rettgeri* y *Morganella morgani*, respectivamente), especies de *Providencia*, preferiblemente *P. alcalifaciens*, *P. stuartii* y *P. rettgeri* (también denominada *Proteus rettgeri*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Rickettsia*, *Rochalimaia henselae*, especies de *Salmonella*, preferiblemente *S. enteridis*, *S. typhi* y *S. derby*, y más preferiblemente especies de *Salmonella* de tipo *Salmonella* DT104, especies de *Serratia*, preferiblemente *S. marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, *Spirillum minor*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus*, preferiblemente *S. faecalis*, *S. faecium* y *S. durans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (p.ej., el polipéptido Sfb1), *Treponema carateum*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, preferiblemente *T. pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, y *Yersinia pestis*.

Por ejemplo, los vehículos inmunogénicos parasitarios se pueden aislar y/u obtener de *Malaria* (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*), *Schistosomas*, *Trypanosomas*, *Leishmania*, nemátodos filarias, *Tricomoniiasis*, *Sarcosporidiasis*, *Taenia* (*T. saginata*, *T. solium*), *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinelosis* (*Trichinella spiralis*) o *Coccidiosis* (especie *Eimeria*).

Se pueden aislar y/u obtener vehículos inmunogénicos fúngicos ilustrativos de un hongo seleccionado entre *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Coccidioidomycosis*.

Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, de vehículos inmunogénicos de polipéptidos solubles en agua incluyen polipéptidos naturales, semisintéticos o sintéticos o proteínas de bacterias o virus. En una realización, los productos bacterianos que se usan como vehículos incluyen proteínas de la pared bacteriana y otros productos (por ejemplo, de la pared celular de *Streptococcus* o *Staphylococcus*) y antígenos de bacterias solubles. En otra realización, los productos bacterianos que se usan como vehículos incluyen toxinas bacterianas. Las toxinas bacterianas incluyen productos bacterianos que median efectos tóxicos, respuestas inflamatorias, estrés, shocks, secuelas crónicas o mortalidad en un huésped susceptible.

Algunos ejemplos concretos, a título meramente enunciativo, de vehículos poliméricos no solubles en agua incluyen, agarosa de aminoalquilo (como aminopropilo o aminohexilo SEFAROSA; Pharmacia Inc., Piscataway, N.J.), cristal de aminopropilo, dextrano de enlace cruzado y similares, a los que se puede unir una fracción reactiva. Se pueden

utilizar otros vehículos, siempre que haya un grupo funcional disponible para unir de forma covalente un grupo reactivo.

Anticuerpo quimérico: Un anticuerpo que contiene residuos del marco de una especie, como el ser humano, y CDR (que generalmente confieren la unión a antígeno) de otra especie, como un anticuerpo murino que se une específicamente al RET.

Conjugar, unir, conectar o enlazar: Unir de forma covalente una molécula a otra para obtener una molécula de mayor tamaño. Por ejemplo, convertir dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua o unir de forma covalente un hapteno u otra molécula a un polipéptido, como un anticuerpo scFv. En el contexto específico, los términos se refieren también a la unión de un ligando, como una fracción de un anticuerpo, a una molécula efectora ("EM"). El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. "Medios químicos" se refiere a una reacción entre la fracción del anticuerpo y la molécula efectora, de forma que exista un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una sola.

Unido, acoplado: Cuando se aplica a un primer átomo o molécula que se "une o acopla" a un segundo átomo o molécula, puede hacerlo tanto directa como indirectamente. Un anticuerpo secundario proporciona un ejemplo de acoplamiento indirecto. Un ejemplo concreto de acoplamiento indirecto es un anticuerpo primario de conejo anti-hapteno al que se une un anticuerpo de IgG de ratón anti-conejo, al que a su vez se une un anticuerpo de IgG de cabra anti-ratón que está unido covalentemente a una etiqueta detectable.

Epítipo: Un determinante antigénico. Se trata de grupos químicos concretos o secuencias peptídicas contiguas o no contiguas en una molécula que son antigénicos, es decir, que desencadenan una respuesta inmune específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico concreto.

Hapteno: Una molécula, normalmente de pequeño tamaño, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero que por lo general es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica, salvo que se combine con una molécula vehículo.

Homopolímero: Este término se refiere a un polímero formado por la unión de múltiples unidades de un único tipo de especie molecular, como un único monómero (por ejemplo, un aminoácido).

Anticuerpo humanizado: Un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y de cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo del donante que proporciona la CDR. El marco del aceptador de un anticuerpo o inmunoglobulina humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco del donante. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener otras sustituciones conservadoras de aminoácidos que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión del antígeno ni sobre ninguna otra función de la inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas humanizadas se pueden crear mediante ingeniería genética (véase, por ejemplo, la Patente estadounidense nº 5.585.089).

Inmunoglobulina humanizada: una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptadora". En una realización, todas las CDR proceden de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes no tienen que estar presentes, pero, si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90%, como al menos aproximadamente un 95% idénticas o más. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, salvo posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural.

Respuesta inmune: La respuesta de una célula del sistema inmunitario, como linfocitos B, linfocitos T, macrófagos o polimorfonucleocitos, a un estímulo. Una respuesta inmune puede incluir cualquier célula del organismo implicada en una respuesta de defensa del huésped, por ejemplo, una célula epitelial que secreta interferón o una citoquina. Una respuesta inmune incluye, a título meramente enunciativo, una inflamación o respuesta inmune innata.

Composición o conjugado inmunogénico: Un término utilizado en el presente para referirse a una composición útil para estimular o provocar una respuesta inmune concreta (o respuesta inmunogénica) en un vertebrado. En algunas realizaciones, la respuesta inmunogénica es protectora o proporciona una inmunidad protectora, en el sentido de que permite al animal vertebrado resistir mejor la progresión de la enfermedad o de la infección por el organismo contra el que se dirige la composición inmunogénica. Un ejemplo específico de un tipo de composición inmunogénica es una vacuna.

Inmunógeno: Un compuesto, composición o sustancia que es capaz, en las condiciones apropiadas, de estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo composiciones que son inyectadas o absorbidas por el animal.

Dosis inmunológicamente efectiva: Una dosis inmunológicamente efectiva de los conjugados divulgados en el presente es terapéuticamente efectiva y evitará, tratará, aliviará o atenuará la gravedad, el alcance o la duración de una enfermedad o condición.

Condiciones inmunológicamente reactivas: Se refiere a condiciones que permiten que un anticuerpo activado contra un epítipo concreto se una a ese epítipo en un grado detectablemente mayor que (y/o con una exclusión importante) la unión a sustancialmente todos los demás epítopos. Las condiciones inmunológicamente reactivas son dependientes del formato de la reacción de unión del anticuerpo y típicamente son las que se utilizan en protocolos de inmunoensayo de las condiciones que se encuentran in vivo. Véase Harlow & Lane, más arriba, para obtener una descripción de los formatos y condiciones de los inmunoensayos. Las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los métodos son "condiciones fisiológicas" que se refieren a condiciones (como temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas en el interior de una célula de mamífero o un mamífero vivo. A pesar de que se reconoce que algunos órganos están sujetos a condiciones extremas, por lo general el entorno intracelular y en el interior del organismo tiene aproximadamente un pH 7 (es decir, entre un pH 6.0 y un pH 8.0, más típicamente entre un pH 6.5 y un pH 7.5), contiene agua como el solvente predominante y existe a una temperatura superior a 0°C e inferior a 50°C. La osmolaridad se encuentra dentro del rango que favorece la proliferación y viabilidad celular.

Inhibir o tratar una enfermedad: Inhibir el pleno desarrollo de una enfermedad o condición, por ejemplo, en un sujeto que corre el riesgo de padecer una enfermedad como el antrax. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o condición patológica después de que su evolución haya comenzado. Para los fines del presente, el término "mejorar" con respecto a una enfermedad, una condición patológica o un síntoma, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso se puede poner de manifiesto, por ejemplo, por un aplazamiento en la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible, una reducción de la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, una ralentización de la progresión de la enfermedad, una reducción del número de recaídas de la enfermedad, una mejora de la salud o el bienestar general del sujeto, o cualesquiera otros parámetros conocidos en la técnica que son específicos para la enfermedad concreta.

Aislado: Un microorganismo "aislado" (como un virus, una bacteria, un hongo o un protozoo) que ha sido sustancialmente separado o purificado de microorganismos de diferentes tipos, cepas o especies. Los microorganismos se pueden aislar a través de diversas técnicas, incluyendo la dilución en serie y el cultivo.

Un componente biológico "aislado" (como una molécula de ácido nucleico, proteína u organela) ha sido sustancialmente separado o purificado de otros componentes biológicos de la célula del organismo en la que el componente se encuentra naturalmente presente, como otras organelas, proteínas, ARN y ADN cromosómico y extracromosómico. Los ácidos nucleicos y proteínas que han sido "aislados" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación estándar. El término también incluye ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos o proteínas químicamente sintetizados o fragmentos de los mismos.

Etiqueta detectable: Un compuesto o una composición detectable que está unido directa o indirectamente a otra molécula, como un anticuerpo o una proteína, para facilitar la detección de esa molécula. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, incluyen enzimas y etiquetas fluorescentes e isótopos radiactivos.

Péptido conector: Un péptido de un fragmento de unión de un anticuerpo (como un fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente la cadena pesada variable a la cadena ligera variable. "Conector" también se puede referir a un péptido que sirve para unir una fracción focalizada, como un scFv, a una molécula efectora, como una citotoxina o una etiqueta detectable.

Mamífero: Este término incluye tanto mamíferos humanos como no humanos. Del mismo modo, el término "sujeto" incluye tanto sujetos humanos como veterinarios.

Molécula de interés o diana: Una molécula cuya presencia, ubicación y/o concentración está por determinar. Algunos ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas y secuencias de ácido nucleico marcadas con haptenos.

Anticuerpo monoclonal: Un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo obteniendo células híbridas productoras de anticuerpos a partir de la fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Multiplexar, multiplexado: Realizaciones de la presente invención permiten detectar múltiples dianas en una muestra de forma sustancialmente simultánea, o de forma secuencial, según se desee, utilizando una pluralidad de conjugados diferentes. Multiplexar puede incluir identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos, generalmente ADN, ARN, péptidos, proteínas, tanto individualmente como en todas y cada una de las combinaciones. Multiplexar también puede incluir detectar dos o más genes, mensajeros y proteínas en una célula en su contexto anatómico.

Nanopartícula: Una partícula a nanoescala con un tamaño que se mide en nanómetros, por ejemplo, una partícula nanoscópica que tiene al menos una dimensión inferior a unos 100 nm. Algunos ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas metálicas, materiales de pseudofullereno, nanotubos inorgánicos, dendrímeros (como con quelatos metálicos unidos covalentemente), nanofibras, nanocuernos, nanocebellas, nanobarras, nanocuerdas y quantum dots. Una nanopartícula puede producir una señal detectable, por ejemplo, mediante la absorción y/o emisión de fotones (incluyendo fotones visibles y de radiofrecuencia) y la resonancia de plasmón.

Neoplasia y tumor: El proceso de crecimiento anómalo y descontrolado de las células. La neoplasia es un ejemplo de trastorno proliferativo.

El producto de la neoplasia es un tumor, que es un crecimiento anómalo de tejido que se produce como consecuencia de una división celular excesiva. Un tumor que no está sujeto a metástasis se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o está sujeto a metástasis se denomina "maligno". Algunos ejemplos de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (como leucemia (granulocítica) mielocítica crónica, leucemia mielogenosa crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (indolente y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Algunos ejemplos de tumores sólidos, como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfóide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitoma, carcinoma de glándulas subéreas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores CNS (como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

Vehículos farmacéuticamente aceptables: Los vehículos (portadores) farmacéuticamente aceptables útiles en la presente divulgación son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de una o más moléculas o compuestos terapéuticos, como una o más moléculas de ácido nucleico SARS-CoV, proteínas o anticuerpos que se unen a estas proteínas, y otros agentes farmacéuticos. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se debe distinguir del "vehículo" anteriormente descrito en relación con un conjugado de hapteno/vehículo o un conjugado de antígeno/vehículo.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo de administración concreto que se vaya a emplear. Por ejemplo, por lo general las formulaciones parenterales comprenden líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéuticos y fisiológicamente aceptables, tales como agua, suero fisiológico, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para las composiciones sólidas (por ejemplo, en forma de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio de grado farmacéutico. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes o tensioactivos, conservantes y potenciadores del pH o similares, como acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Polipéptido: Un polímero en el que los monómeros son residuos de aminoácidos que se unen a través de enlaces amida. Cuando los aminoácidos son alfa-aminoácidos, se puede utilizar el isómero L-óptico o el isómero D-óptico. Se entiende que los términos "polipéptido" o "proteína" utilizados en el presente abarcan cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas como glucoproteínas. Se entiende específicamente que el término "polipéptido" cubre las proteínas naturalmente presentes, así como aquellas que se producen recombinante o sintéticamente.

El término "residuo" o "residuo de aminoácido" incluye una referencia a un aminoácido que está incorporado a una proteína, polipéptido o péptido.

Proteína: Una molécula, particularmente un polipéptido, compuesto de aminoácidos.

Purificado: El término "purificado" no exige una pureza absoluta, sino que se debe interpretar como un término relativo. Así, por ejemplo, un péptido, proteína, conjugado u otro compuesto activo purificado es aquel que se ha aislado, en su totalidad o en parte, de las proteínas u otros contaminantes. Por lo general, los péptidos, proteínas, conjugados u otros compuestos activos sustancialmente purificados que se utilizan dentro de la divulgación comprenden más del 80% de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación antes de la agregación o formulación del péptido, proteína, conjugado u otro compuesto activo con un vehículo farmacéutico, excipiente, solución tampón, agente potenciador de la absorción, estabilizante, conservante, adyuvante u otro ingrediente en una formulación farmacéutica completa para administración terapéutica. Más típicamente, el péptido, proteína, conjugado u otro compuesto activo está purificado cuando representa más del 90% y a menudo más del 95% de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación purificada antes de la agregación con otros ingredientes de la formulación. En otros casos, la preparación purificada puede ser básicamente homogénea, donde las demás especies macromoleculares no son detectables mediante técnicas convencionales.

Quantum dot: Una partícula a nanoescala que presenta unas propiedades ópticas y electrónicas dependientes del tamaño debido al confinamiento cuántico. Los quantum dots se han producido, por ejemplo, con materiales semiconductores (p.ej., selenido de cadmio y sulfuro de plomo) y con cristalitas (obtenidas mediante epitaxia de haz molecular), etc. Diversos quantum dots con diferentes características de fluorescencia y químicas de superficie son comercializados por Invitrogen Corporation, Eugene, OR (véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses nº 6.815.064 , 6.682.596 y 6.649.138 , cada una de las cuales queda incorporada al presente por referencia). Los quantum dots también son comercializados por Evident Technologies (Troy, NY). Otros quantum dots incluyen los quantum dots de aleaciones, tales como ZnSSe, ZnSeTe, ZnSTe, CdSSe, CdSeTe, ScSTe, HgSSe, HgSeTe, HgSTe, ZnCdS, ZnCdSe, ZnCdTe, ZnHgS, ZnHgSe, ZnHgTe, CdHgS, CdHgSe, CdHgTe, ZnCdSSe, ZnHgSSe, ZnCdSeTe, ZnHgSeTe, CdHgSSe, CdHgSeTe, InGaAs, GaAlAs, y InGaN (los quantum dots de aleaciones y los métodos para su producción se describen, por ejemplo, en la Publicación de solicitud estadounidense nº 2005/0012182 y Publicación PCT WO 2005/001889).

Grupos reactivos: Las fórmulas que aparecen a lo largo de toda esta solicitud se refieren a "grupos reactivos", que pueden ser cualquiera de una variedad de grupos adecuados para acoplar una primera unidad a una segunda unidad, tal como se describe en el presente. Por ejemplo, el grupo reactivo podría ser un grupo amina reactivo, como un isotiocianato, un isocianato, una acil azida, un éster de NHS, un cloruro de ácido, como un cloruro de sulfonilo, aldehídos y glioxales, epóxidos y oxiranos, carbonatos, agentes quelantes, imidoésteres, carbodiimidos, anhídridos y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales tiol reactivos adecuados incluyen haluros de alquilo y haloacetilo, maleimidias, aziridinas, derivados de acrililo, agentes quelantes, reactivos de intercambio tiol-disulfuro, tales como disulfuros de piridilo, TNB-tiol y reductores de disulfuro, y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales carboxilato reactivos adecuados incluyen diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, compuestos de carbonildiimidazol y carbodiimidias. Los grupos funcionales hidroxilo reactivos incluyen epóxidos y oxiranos, carbonildiimidazol, N,N'-disuccinimidil carbonatos o N-hidroxisuccinimidil cloroformatos, compuestos oxidantes de periodato, oxidación enzimática, halógenos de alquilo e isocianatos. Los grupos funcionales aldehído y cetona reactivos incluyen hidrazinas, bases de Schiff, productos de aminación reductora, productos de condensación de Mannich y combinaciones de los mismos. Los compuestos activos hidrógeno reactivos incluyen derivados de diazonio, productos de la condensación de Mannich, productos de reacción de yodación y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales fotoreactivos químicos incluyen aril azidas, aril azidas halogenadas, benzofononas, compuestos diazo, derivados de diazirina y combinaciones de los mismos.

Muestra: Una muestra biológica que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína o combinaciones de los mismos, obtenida de un sujeto. Algunos ejemplos incluyen, a título meramente enunciativo, sangre periférica, orina, saliva, biopsia de tejido, muestra quirúrgica, muestras de amniocentesis y material de una autopsia. En un ejemplo, una muestra incluye una biopsia de un adenocarcinoma, una muestra de tejido no canceroso, una muestra de tejido normal (de un sujeto que no padece ninguna enfermedad o trastorno conocido).

Fracción de unión específica: Un miembro de un par de unión específica. Los pares de unión específica son pares de moléculas que se caracterizan porque se unen entre sí, con una exclusión importante de la unión a otras moléculas. Por ejemplo, los pares de unión específica pueden tener una constante de unión al menos 10^3 M^{-1} , 10^4 M^{-1} o 10^5 M^{-1} mayor que la constante de unión de cualquiera de los dos miembros del par de unión con otras moléculas de una muestra biológica). Algunos ejemplos concretos de fracciones de unión específica incluyen proteínas (como anticuerpos, lectinas, avidinas como estreptavidinas y proteína A), secuencias de ácido nucleico y proteína-ácidos nucleicos de unión específica. Las fracciones de unión específica también pueden incluir las moléculas (o porciones de las mismas) a las que se unen de forma específica estas proteínas de unión específica.

Cantidad terapéuticamente efectiva: Una cantidad de un agente especificado suficiente para conseguir un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado con dicho agente. Por ejemplo, puede ser la cantidad de un conjugado útil para aumentar la resistencia, prevenir, mejorar y/o tratar una infección y enfermedad. Idealmente, una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente es una cantidad suficiente para aumentar la resistencia, prevenir, mejorar y/o tratar una infección, sin causar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. La cantidad efectiva de un agente útil para aumentar la resistencia, prevenir, mejorar y/o tratar la infección y enfermedad en un sujeto dependerá del sujeto que está siendo tratado, la gravedad de la aflicción y la forma de administración de la composición terapéutica.

Vacuna: Una vacuna es una composición farmacéutica que provoca una respuesta inmune profiláctica o terapéutica en un sujeto. En algunos casos, la respuesta inmune es una respuesta protectora. Típicamente, la vacuna provoca una respuesta inmune específica para un antígeno de un patógeno, por ejemplo, un patógeno bacteriano o viral, o a un componente celular correlacionado con una condición patológica. Una vacuna puede incluir un polinucleótido, un péptido o polipéptido, un polisacárido, un virus, una bacteria, una célula o uno o más componentes celulares. En algunos casos, el virus, la bacteria o célula puede estar inactivada o atenuada para evitar o reducir la probabilidad de infección, al tiempo que se mantiene la inmunogenicidad del componente de la vacuna.

El polipéptido antigénico puede ser el de un rotavirus o de un virus diferente de un rotavirus. Una lista, a título meramente enunciativo y ni mucho menos exhaustiva, de estos otros virus incluye virus adenoasociados, adenovirus, virus de la bronquitis infecciosa aviar, baculovirus, varicela, coronavirus, citomegalovirus, virus del moquillo, enterovirus, virus de Epstein Barr, virus de la leucemia felina, flavivirus, virus de la fiebre aftosa, hepatitis

- A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis E, especies de Herpes, herpes simple, virus de la gripe, VIH-1, VIH-2, HTLV 1, gripe A y B, virus Kunjin, virus de la fiebre de Lassa, LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica), lentivirus, virus del sarampión, mengovirus, morbillivirus, mixovirus, virus del papiloma, parovirus, virus paragripal, paramixovirus, parvovirus, virus M'Poko, virus de la polio, poliomavirus, virus de la pseudorabia, virus de la rabia, reovirus, virus sincitial respiratorio, retrovirus, rinovirus, virus de la peste bovina, rotavirus, virus de los bosques de Semliki, virus Sendai, virus del simio 40, virus Sindbis, SV5, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, togavirus (rubeola, fiebre amarilla, dengue), Vaccinia virus, encefalomiелitis equina venezolana, virus de la estomatitis vesicular, metaneumovirus, norovirus, virus SARS, virus de la viruela, picornavirus, virus varicela-zóster y virus del Nilo Occidental.
- 10 Alternativamente, el polipéptido antigénico puede ser el de una bacteria u otro organismo patógeno. Entre los ejemplos de polipéptidos bacterianos se incluyen los de *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, preferiblemente *A. anitratus*, *A. haemolyticus*, *A. alcaligenes*, y *A. lwoffii*, *Actinomyces israelii*, *Aeromonas hydrophilia*, especies de *Alcaligenes*, preferiblemente *A. faecalis*, *A. odorans* y *A. denitrificans*, *Arizona hinshawii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, especies de *Brucella*, preferiblemente *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. canis*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Campylobacter coli* (p.Ej., el polipéptido CjaA), *Campylobacter fetus* ssp. *intestinalis*, *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*, especies de *Chlamydia*, preferiblemente *C. psittaci* y *C. trachomatis*, *Chromobacterium violaceum*, especies de *Citrobacter*, preferiblemente *C. freundii* y *C. diversus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium*, preferiblemente *C. ulcerans*, *C. haemolyticum* y *C. pseudotuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Edwardsiella tarda*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacter*, preferiblemente *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. hafniae* (también denominada *Hafnia alvei*) y *E. agglomerans*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Helicobacter* (p.ej., el polipeptido UreB de *H. pylori*), especies de *Klebsiella*, preferiblemente *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*, especies de *Legionella*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Moraxella*, preferiblemente *M. lacunata* y *M. osloensis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* (p.ej., el polipéptido CFP10), especies de *Mycoplasma*, preferiblemente *M. pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, especies de *Nocardia*, preferiblemente *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Peptococcus magnus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pneumococci*, especies de *Proteus*, preferiblemente *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri* y *P. morgani* (también denominadas *Providencia rettgeri* y *Morganella morgani*, respectivamente), especies de *Providencia*, preferiblemente *P. alcalifaciens*, *P. stuartii* y *P. rettgeri* (también denominada *Proteus rettgeri*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Rickettsia*, *Rochalimaima henselae*, especies de *Salmonella*, preferiblemente *S. enteridis*, *S. typhi* y *S. derby*, y más preferiblemente especies de *Salmonella* de tipo *Salmonella* DT104, especies de *Serratia*, preferiblemente *S. marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, *Spirillum minor*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus*, preferiblemente *S. faecalis*, *S. faecium* y *S. durans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (p.ej., el polipéptido Sfb1), *Treponema carateum*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenu*, preferiblemente *T. pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, y *Yersinia pestis*.
- Los antígenos o haptenos parasitarios puede seleccionarse, por ejemplo, entre *Malaria* (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*), *Schistosomas*, *Trypanosomas*, *Leishmania*, nemátodos filarias, *Trichomoniasis*, *Sarcosporidiasis*, *Taenia* (*T. saginata*, *T. solium*), *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinelosis* (*Trichinella spiralis*) o *Coccidiosis* (*Eimeria* species).
- 45 Algunos ejemplos de antígenos o haptenos fúngicos se podrían obtener de un hongo seleccionado entre *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Coccidioidomycosis*.
- El antígeno o hapteno también se puede obtener de cualquier animal, incluyendo, por ejemplo, vertebrados. Así, por ejemplo, el hapteno o antígeno puede comprender componentes obtenidos de ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana y mioglobulina de cachalote.
- 50 Algunos ejemplos de vehículos apropiados son aquellos que pueden incrementar la inmunogenicidad del conjugado y/o activar los anticuerpos contra el vehículo, que son beneficiosos desde el punto de vista del diagnóstico, analítico y/o terapéutico. Algunos vehículos útiles incluyen vehículos poliméricos, que pueden ser materiales naturales, semisintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales, por ejemplo grupos amino primarios y/o secundarios, grupos azido, grupos hidroxilo o grupos carboxilo, a los que se puede unir una fracción reactiva. El vehículo puede ser soluble o insoluble en agua y en algunas realizaciones es una proteína o un polipéptido. Por lo general, los vehículos que satisfacen estos criterios son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Fattom et al., *Infect. Immun.* 58:2309-12, 1990 ; Devi et al., *PNAS* 88:7175-79, 1991 ; Szu et al., *Infect. Immun.* 59:4555-61, 1991 ; Szu et al., *J. Exp. Med.* 166:1510-24, 1987 ; y Pavliakova et al., *Infect. Immun.* 68:2161-66, 2000). Un vehículo puede ser útil incluso si el anticuerpo que induce no es beneficioso por sí mismo.
- 60 Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, de vehículos polipeptídicos solubles en agua incluyen los polipéptidos naturales, semisintéticos o sintéticos o las proteínas de bacterias y virus. En una realización, los productos bacterianos que se usan como vehículos incluyen proteínas de la pared bacteriana (por ejemplo, de la

pared de Streptococcus o Staphylococcus) y antígenos de bacterias solubles. En otra realización, los productos bacterianos que se usan como vehículos incluyen toxinas bacterianas. Las toxinas bacterianas incluyen productos bacterianos que median efectos tóxicos, respuestas inflamatorias, estrés, shocks, secuelas crónicas o mortalidad en un huésped susceptible.

- 5 Algunos ejemplos concretos, a título meramente enunciativo, de vehículos no solubles en agua incluyen, agarosa de aminoalquilo (como aminopropilo o aminohehexilo SEFAROSA; Pharmacia Inc., Piscataway, N.J.), cristal de aminopropilo, dextrano de enlace cruzado y similares, a los que se puede unir una fracción reactiva. Se pueden utilizar otros vehículos, siempre que haya un grupo funcional disponible para unir de forma covalente un grupo reactivo.

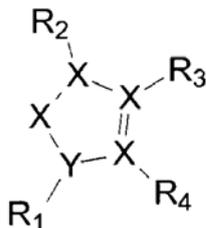
10 II. Haptenos

Entre las realizaciones divulgadas de estos haptenos se incluyen pirazoles, particularmente nitropirazoles; compuestos de nitrofenilo; benzofurazanos; triterpenos; ureas y tioureas, particularmente fenilureas, e incluso más particularmente feniltioureas; rotenona y derivados de rotenona, también denominados en el presente rotenoides; oxazoles y tiazoles, particularmente sulfonamidas de oxazol y tiazol; cumarina y derivados de cumarina; ciclolignanos, ejemplificados por podofilotoxina y derivados de podofilotoxina, y combinaciones de los mismos.

15 Para las fórmulas generales que se proporcionan a continuación, si no se ha indicado ningún sustituyente, un experto en la técnica entenderá que el sustituyente es hidrógeno. Un enlace que no está conectado con un átomo, pero que se muestra, por ejemplo, extendiéndose hasta el interior de un sistema de anillo, indica que la posición de ese sustituyente es variable. Una línea curva dibujada a través de un enlace indica que alguna estructura adicional está unida a esa posición, típicamente un conector o la fracción o el grupo funcional utilizado para acoplar el hapteno a un vehículo. Por otra parte, si no se indica ninguna esteoquímica para los compuestos que tienen uno o más centros quirales, se incluyen todos los enantiómeros y diastereómeros. De forma similar, en la relación de los grupos alifáticos o alquilo, también se incluyen todos los isómeros estructurales de los mismos.

25 1. Azoles

Una primera clase general de haptenos de la presente divulgación son los azoles, normalmente oxazoles y pirazoles, más típicamente nitro oxazoles y nitro pirazoles, que tienen la fórmula química general siguiente.



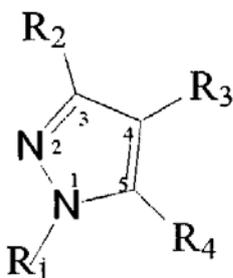
30 Con respecto a esta fórmula general, n es 0-2, más típicamente 0 o 1. R₁-R₄ puede ser cualquier grupo orgánico que no interfiere ni facilita potencialmente la función como hapteno. Más concretamente, R₁-R₄ se selecciona independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, p.ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p.ej., -CX₃ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p.ej., metoximina, CH₃-O-N=) alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, ciano (-CN),

35 éster, eter, exometileno, halógeno, heteroarilo, heterocíclico, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes de R₁-R₄ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos uno de los sustituyentes de R₁-R₄ está unido a un conector o es un grupo funcional adecuado para acoplarse a un conector o una molécula vehículo. R₁-R₄ más típicamente son alifático, hidrógeno o grupos nitro, incluso más típicamente alquilo, hidrógeno o nitro, y todavía más típicamente alquilo inferior (10 átomos de carbono o menos), hidrógeno, nitro o combinaciones de los mismos. El número de grupos nitro puede variar, aunque típicamente hay 1 o 2 grupos nitro. X es independientemente nitrógeno o carbono. Y es oxígeno, azufre o nitrógeno. Si Y es oxígeno o azufre, no hay ningún grupo R₁ y n = 0. Si Y es nitrógeno, entonces hay al menos un grupo R₁.

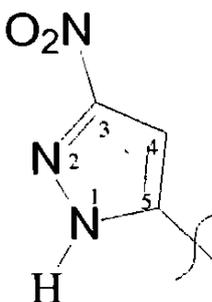
50 Un experto en la técnica apreciará que, en el caso de los compuestos que tienen dos o más grupos W, las posiciones relativas de las mismas son variables. Por ejemplo, un diazol podría tener átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 2 o en las posiciones 1 y 3. Por otra parte, también son posibles más de dos heteroátomos, como en el caso de las triazinas.

Al menos uno de R₁-R₄ para estos compuestos de azol está unido a algún otro grupo o es un grupo funcional variable. Por ejemplo, los compuestos ilustrados se pueden acoplar directamente a un vehículo o a un conector en cualquiera de las posiciones apropiadas sobre el anillo de azol.

- 5 Las realizaciones operativas típicamente fueron derivadas de monopirazol o dinitropirazo, de forma que al menos uno de R₁-R₄ es un grupo nitro y puede que dos de R₁-R₄ sean grupos nitro, con los restantes R₁-R₄ utilizándose para acoplar el hapteno a un conector o vehículo.



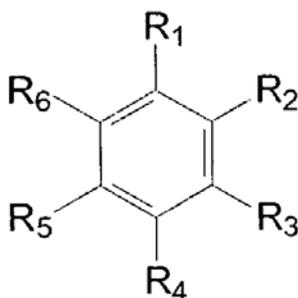
Un compuesto concreto tenía la estructura siguiente.



10

2. Nitroarilo

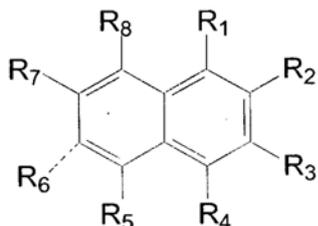
- 15 Una segunda clase general de haptenos de la presente divulgación son compuestos de nitroarilo. Algunos ejemplos de nitroarilo incluye, a título meramente enunciativo, nitrofenilo, nitrobifenilo, nitrotrifenilo, etc., y todas y cada una de las contrapartes de heteroarilo, que presentan la fórmula química general siguiente



- 20 Con respecto a la fórmula general, estos compuestos tienen al menos uno y opcionalmente varios grupos nitro. Por tanto, al menos uno de R₁-R₆ es nitro. Si más de uno de R₁-R₆ es nitro, todas las combinaciones de las posiciones relativas del anillo de varios sustituyentes de nitro, o sustituyentes de nitro con respecto a otros sustituyentes del anillo, se incluyen en esta clase de haptenos divulgada. Los compuestos de dinitroarilo son los más típicos. Un experto en la técnica apreciará que a medida que aumenta el número de grupos nitro, disminuye el número de sustituyentes del anillo restantes en la fórmula general. Estos sustituyentes se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, p.ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomo de carbono, como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p.ej., -CX₃ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p.ej., metoximina,
- 25
- 30

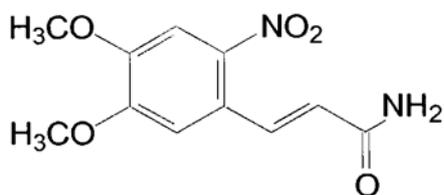
5 $\text{CH}_3\text{-O-N=}$ alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano ($-\text{CN}$), éster, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrido, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes $\text{R}_1\text{-R}_6$ está unido a un conector o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o una molécula vehículo.

10 Dos o más de estos sustituyentes de $\text{R}_1\text{-R}_6$ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono en un sistema de anillo, como derivados tipo naftaleno (mostrado más abajo) o antraceno. Se pueden formar sistemas de anillo distintos de sistemas de anillo de 6 miembros, como sistemas de anillo 5-6 fusionados.

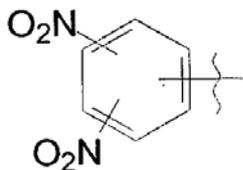


15 Una vez más, al menos una de las posiciones del anillo ocupadas por $\text{R}_1\text{-R}_8$ está unida a un conector o grupo funcional variable adecuado para el acoplamiento, por ejemplo mediante enlace covalente, a una molécula vehículo. Por ejemplo, los compuestos de nitroarilo de la presente divulgación pueden incluir un grupo funcional para su acoplamiento a un vehículo, o a un conector, en varias ubicaciones opcionales del anillo.

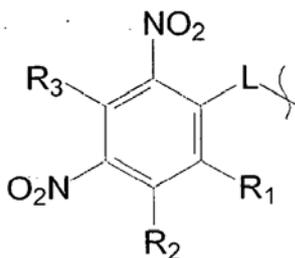
20 Las realizaciones operativas se ejemplifican mediante compuestos de nitrofenilo. Solo a modo de ejemplo, los compuestos de mononitroarilo se ejemplifican mediante compuestos de nitrocianamida. Una realización de un compuesto a base de nitrocianamida se ejemplifica mediante 4,5-dimetoxi-2-nitrocianamida, como se muestra más abajo.



25 La clase de compuestos de nitrofenilo también se representa mediante compuestos de dinitrofenilo. Al menos uno de los restantes átomos de carbono de las posiciones del anillo que no tiene un grupo nitro se une a un grupo funcional, a un conector o directamente a un vehículo. Todas y cada una de las combinaciones de las posiciones relativas de estos grupos se incluyen dentro de la clase de haptenos divulgada.



Las realizaciones operativas se ejemplifican más particularmente mediante compuestos de 2,4-dinitrofenilo unidos a un conector, tal como se ilustra más abajo.

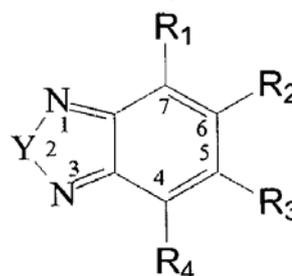


R₁-R₃ son los indicados anteriormente.

5

3. Benzofurazanos

Los benzofurazanos y sus derivados son otra clase de haptenos incluida en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general para los compuestos de tipo benzofurazano



10

Los sustituyentes de R₁-R₄ se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, p.ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p.ej., -CX₃ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p.ej., metoximina, CH₃-O-N=) alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éster de alquilo, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes de R₁-R₄ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado con los compuestos que tienen la fórmula general mostrada. Al menos uno de los sustituyentes de R₁-R₄ está unido a un conector o directamente a un vehículo. Y es un átomo de carbono que tiene los sustituyentes de R₅ y R₆, donde R₅ y R₆ son los indicados para R₁-R₄, oxígeno o azufre, típicamente oxígeno.

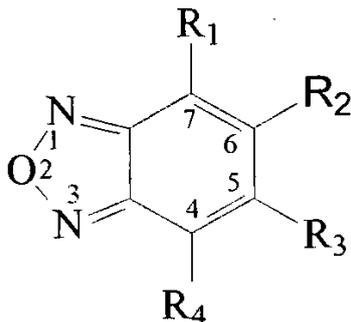
15

20

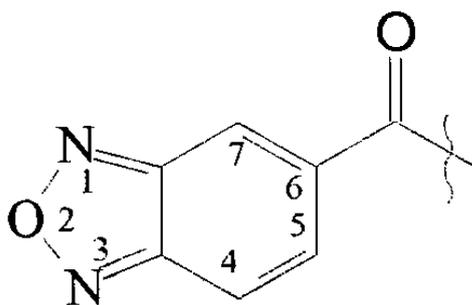
25

Los compuestos en los que Y es oxígeno se ejemplifican más particularmente mediante compuestos que tienen la estructura siguiente, donde R₁-R₄ son los anteriormente indicados, y más típicamente son independientemente hidrógeno y alquilo inferior.

30

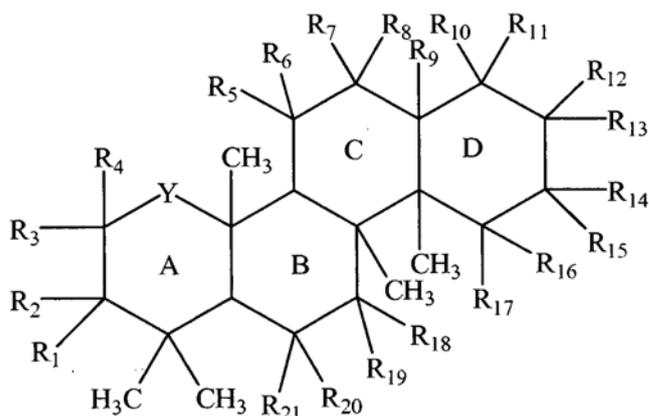


Una realización operativa de un compuesto conforme a esta clase de haptenos tenía la estructura química siguiente.



5 4. Triterpenos

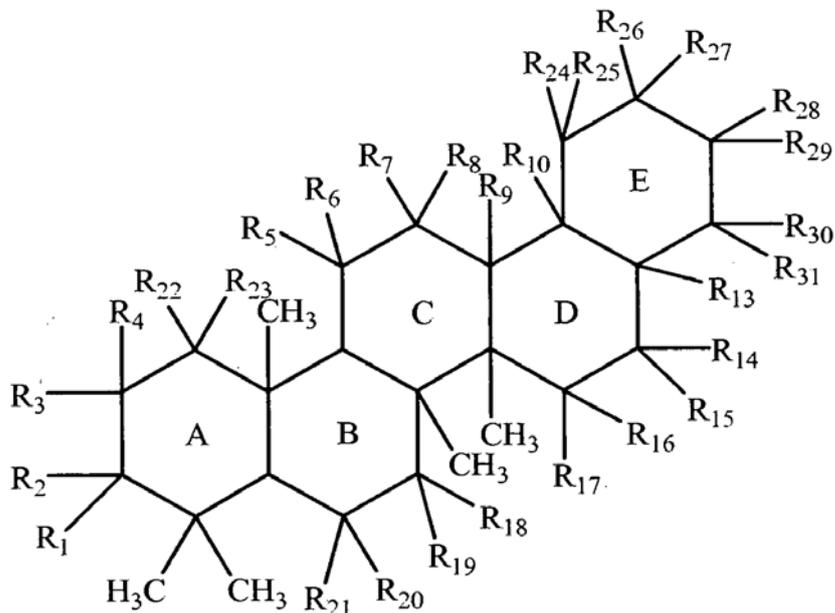
Los triterpenos son otra clase de haptenos incluida en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. La estructura de anillo básica común a los triterpenos cíclicos tiene anillos fusionados de entre cuatro y seis miembros, A-D como se indica a continuación.



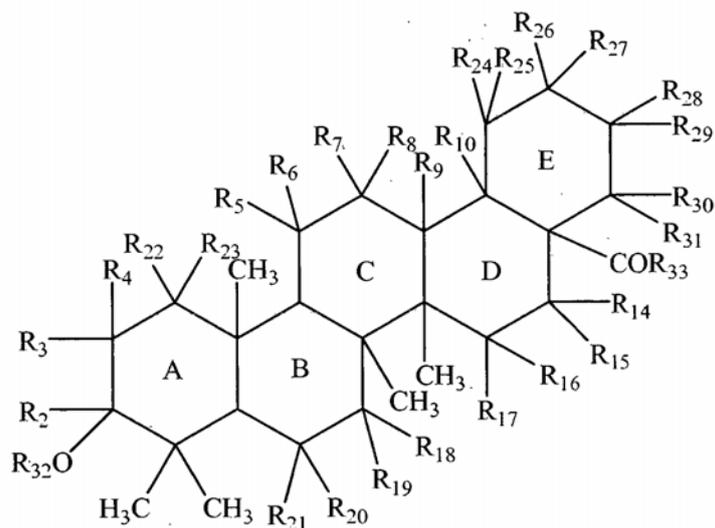
10 Una serie de publicaciones trata sobre las especies de triterpenos naturalmente presentes, semisintéticas y sintéticas dentro del género de los triterpenos útiles para la práctica de la presente divulgación, entre las que se incluyen las siguientes: J.C. Connolly y R. A. Hill, *Triterpenoids*, Nat. Prod. Rep., 19, 494-513 (2002); Baglin et al., *A Review of Natural and Modified Beculinic, Ursolic and Echinocystic Acid Derivatives as Potential Antitumor and Anti-HIV Agents*, Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 3, 525-539; W.N. y M.C. Setzer, *Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic Agents*, Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 3, 540-556 (2003); y Baltina, *Chemical Modification of Glycyrrhizic Acid as a Route to New Bioactive Compounds for Medicine*, Current Medicinal Chemistry, 10, 155-171 (2003); incorporadas al presente por referencia. Basándose en la presente divulgación y las realizaciones operativas de la misma, así como en las divulgaciones proporcionadas por estas publicaciones previas, y con respecto a la primera fórmula general, R₁-R₂₁ se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, p.ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p.ej., -CX₃ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p.ej., metoximina, CH₃-O-N=) alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éster de alquilo, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes de R₁-R₂₁ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado con los compuestos que tienen la fórmula general mostrada. Al menos uno de los sustituyentes R₁-R₂₁ está unido a un conector o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o una molécula vehículo. Y es un enlace, que define por tanto un anillo de 5 miembros, o es un átomo de carbono con los sustituyentes R₂₂ y R₂₃, donde estos grupos R son los anteriormente indicados.

Las realizaciones divulgadas de triterpenos que ejemplifican esta clase de haptenos pueden incluir también un anillo E, que puede tener diversos tamaños de anillo, particularmente anillos que tienen 5-7 átomos, típicamente átomos

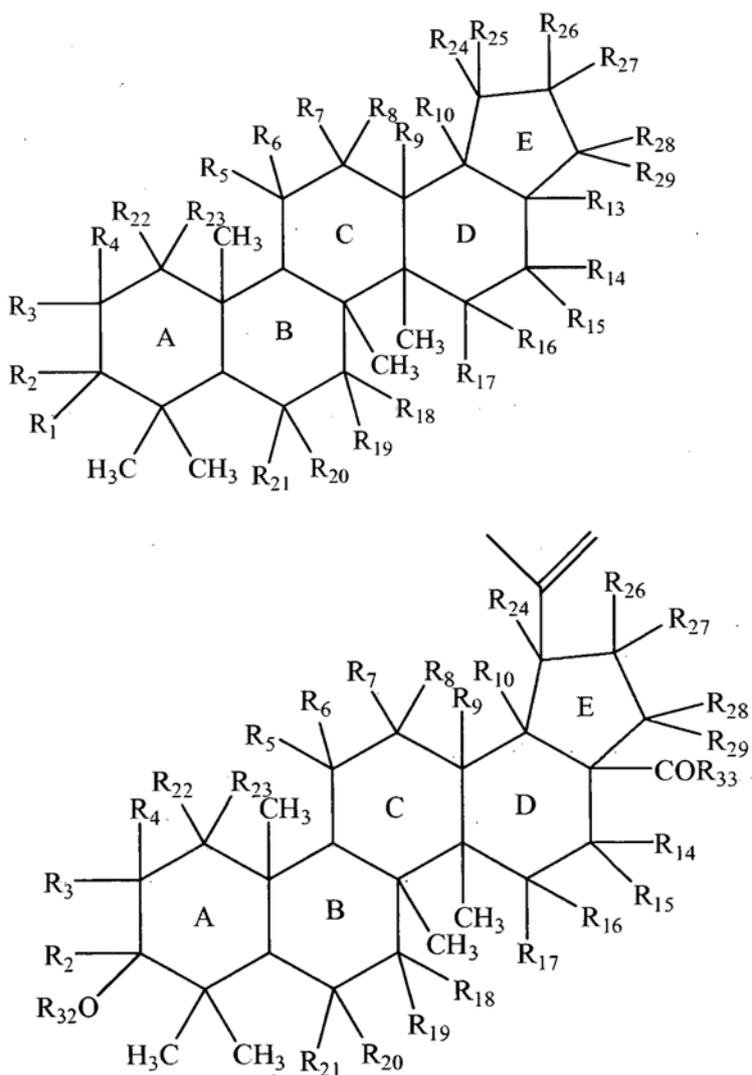
de carbono. Por ejemplo, el anillo E puede ser un anillo de 6 miembros, como se indica en la siguiente fórmula general, donde R₁-R₃₁ son los indicados anteriormente para R₁-R₂₁.



- 5 La siguiente fórmula general indica que el sustituyente de R₁₃ puede ser un grupo acilo que tiene un sustituyente de R₃₃ seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, éster, es decir, -OR₃₄ donde R₃₄ is alifático, típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo, amido, incluyendo amida primaria (-NH₂), amida secundaria (-NHR₃₅) y amida terciaria (-NR₃₅R₃₆), donde R₃₅ y R₃₆ son alifático, típicamente alifático inferior, más típicamente alquilo, alquilo sustituido, y todavía más típicamente alquilo inferior o alquilo inferior sustituido. Esta fórmula general también indica que el sustituyente de R₁ a menudo es un sustituyente de OR₃₂, donde R₃₂ es hidrógeno o alifático, más típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior. Los restantes grupos R son los indicados anteriormente con respecto a la primera fórmula general.
- 10

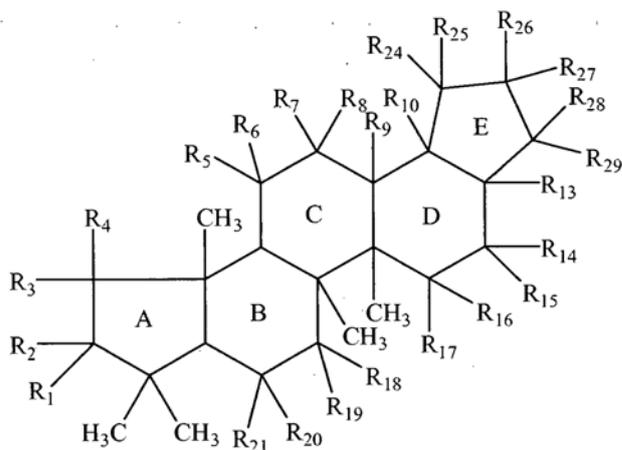


- 15 El anillo E también puede ser un anillo de 5 miembros, tal como se indica en la fórmula siguiente donde los grupos R₁-R₂₉ son los indicados anteriormente para R₁-R₂₁.

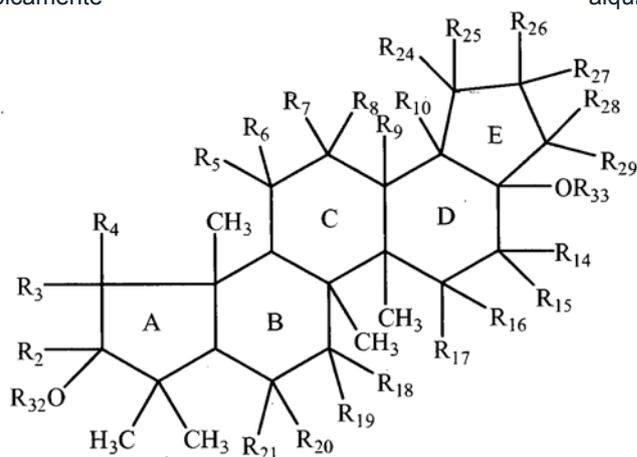


Con respecto a estas fórmulas generales, los R₁-R₂₉ son los indicados anteriormente para R₁-R₂₁.

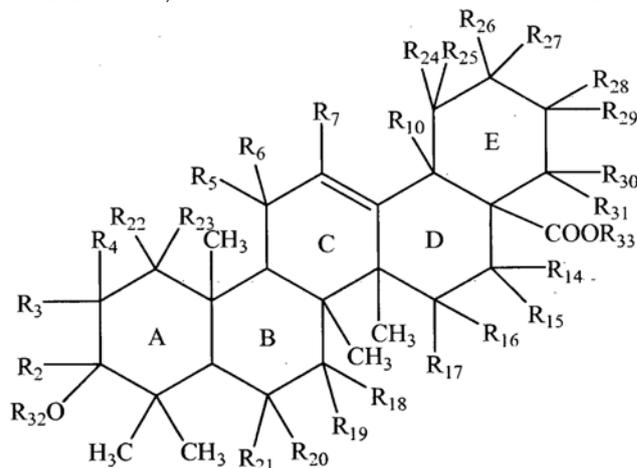
- 5 Como sucede con algunos ejemplos de compuestos en los que el anillo E es un anillo de seis miembros, los compuestos en los que el anillo E tiene 5 miembros también pueden incluir los sustituyentes de R₁ y R₁₃ como se ha señalado anteriormente. Concretamente, esta fórmula general indica que el sustituyente de R₁₃ puede ser un grupo acilo que tiene un sustituyente de R₃₃ seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, éster, es decir, -OR₃₄, donde R₃₄ es alifático, típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior, amido, incluyendo amida primaria (-NH₂), amida secundaria (-NHR₃₅) y amida terciaria (-NR₃₅R₃₆), donde R₃₅ y R₃₆ son alifáticos, típicamente alifáticos inferiores, más típicamente alquilos, alquilos sustituidos, y todavía más típicamente alquilos inferiores o alquilos inferiores sustituidos. Esta fórmula general también indica que el sustituyente de R₁ a menudo es un sustituyente de OR₃₂, donde R₃₂ es hidrógeno o alifático, más típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior.
- 10
- 15 Los compuestos de ejemplo también incluyen anillos de 5 miembros, como el anillo A y el anillo E. Las fórmulas generales de estos compuestos de ejemplo se proporcionan a continuación, donde los sustituyentes de R₁-R₂₉ son los indicados anteriormente.



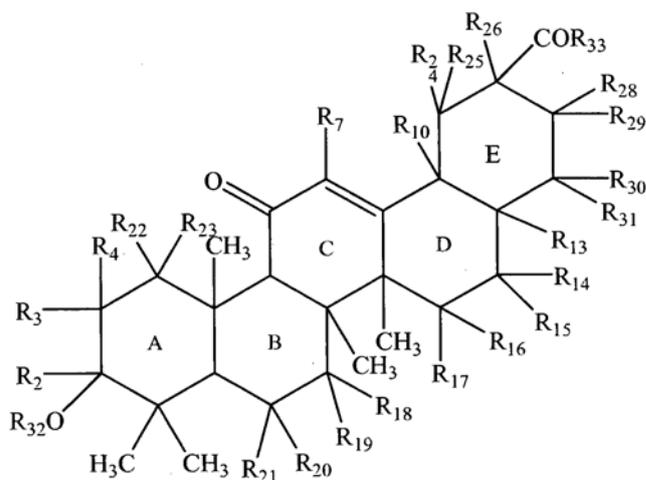
Una vez más, los sustituyentes de R₁ y R₁₃ pueden ser grupos funcionales a base de oxígeno. El sustituyente de R₁₃ puede ser un grupo acilo que tiene un sustituyente de R₃₃ seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo, éster, es decir, -OR₃₄, donde R₃₄ es alifático, típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior, amido, incluyendo amida primaria (-NH₂), amida secundaria (-NHR₃₅) y amida terciaria (-NR₃₅R₃₆), donde R₃₅ y R₃₆ son alifáticos, típicamente alifático inferior, más típicamente alquilo, alquilo sustituido e incluso más típicamente alquilo inferior o alquilo inferior sustituido. Esta fórmula general también indica que el sustituyente de R₁ suele ser un sustituyente de OR₃₂, donde R₃₂ es hidrógeno o alifático, más típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior.



Algunos ejemplos de triterpenos de la presente divulgación también pueden incluir uno o más sitios de insaturación en uno o más de los anillos A-Es. Los compuestos de ejemplo a menudo tienen al menos un sitio de insaturación en el anillo C, como en el doble enlace del anillo C anteriormente indicado.



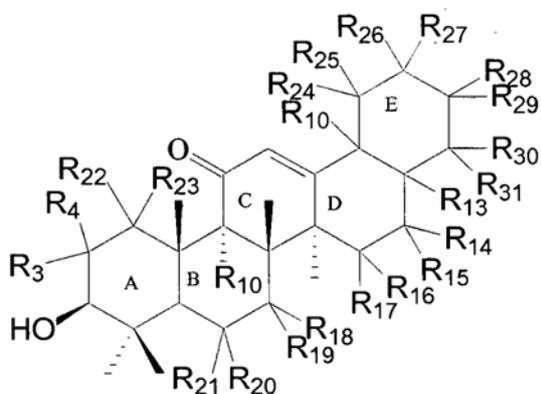
El sitio de insaturación puede ser una cetona insaturada alfa o beta, tal como se ilustra a continuación para el anillo C.



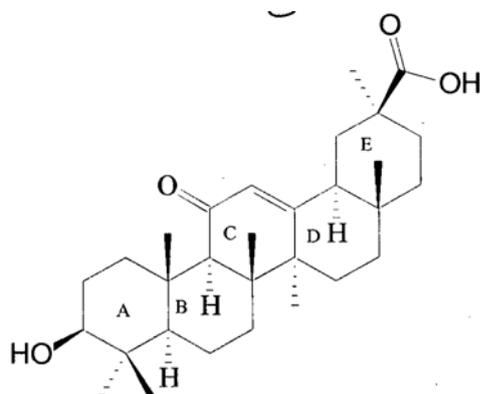
5 Los triterpenos también tienen una serie de átomos de carbono estereogénicos. Un experto en la técnica apreciará que es muy probable que determinados enantiómeros se encuentren naturalmente presentes. A pesar de que el enantiómero naturalmente presente puede estar plenamente disponible y ser efectivo para la práctica de las realizaciones divulgadas, todos los demás estereoisómeros posibles se encuentran incluidos en el ámbito de aplicación de la presente invención. Por otra parte, los triterpenos naturalmente presentes, o derivados sintéticos de los mismos, o compuestos plenamente sintéticos, pueden tener (1) una estereoquímica diferente; (2) sustituyentes diferentes y también pueden ser sustituidos en posiciones diferentes de los compuestos naturalmente presentes. Las fórmulas generales anteriormente proporcionadas no indican la estereoquímica en los centros quirales. Esto quiere decir que los enantiómeros de cada centro quiral, así como todas las combinaciones de isómeros diastereoméricos de los mismos, se encuentran incluidos en el ámbito de aplicación de la presente divulgación.

10 Determinadas realizaciones operativas de la presente divulgación se ejemplifican mediante la siguiente fórmula general, en la que los sustituyentes son los anteriormente indicados.

15



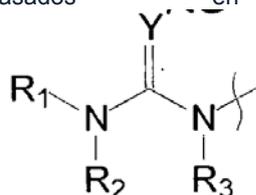
La estereoquímica y los sustituyentes de un triterpeno naturalmente presente útil como hapteno para la práctica de la presente divulgación se muestran a continuación.



5 El grupo hidroxilo del anillo A típicamente se oxida para convertirse en un grupo funcional carbonilo en las realizaciones operativas. Como resultado, el átomo de carbono que contiene el grupo carbonilo ya no es un centro quiral.

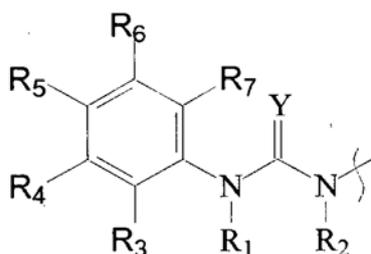
5. Ureas y tioureas

10 Las ureas y tioureas, particularmente ureas y tioureas de arilo y heteroarilo, son otra clase de haptenos incluida en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general de los haptenos basados en urea de la presente divulgación.



15 Con respecto a esta fórmula general, R₁-R₃ son independientemente hidrógeno, alifático, alifático sustituido, típicamente alquilo, alquilo sustituido, y todavía más típicamente alquilo inferior y alquilo inferior sustituido, cíclico, heterocíclico, arilo y heteroarilo. Más concretamente, R₁ es típicamente arilo o alifático, que suele tener al menos un sitio de insaturación para facilitar la actividad cromofórica. R₂ y R₃ suelen ser independientemente hidrógeno y alquilo inferior. Y es oxígeno (derivados de urea) o azufre (tioureas).

Los derivados de arilo típicamente tienen la fórmula siguiente.

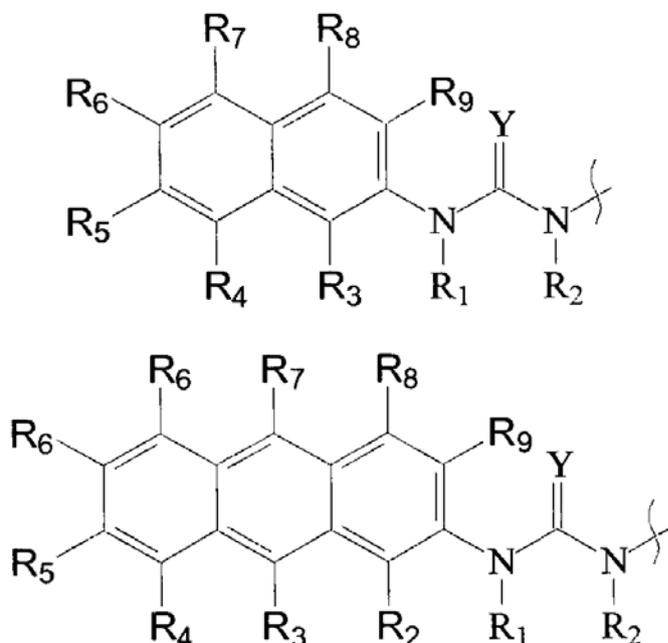


20 R₁-R₇ se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, p.ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p.ej., -CX₃ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p.ej., metoximina, CH₃-O-N=) alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éster de alquilo, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes de R₃-R₇ también está unido a un conector o a una molécula vehículo. Dos o más de estos sustituyentes de R₃-R₇ disponibles para esta unión también

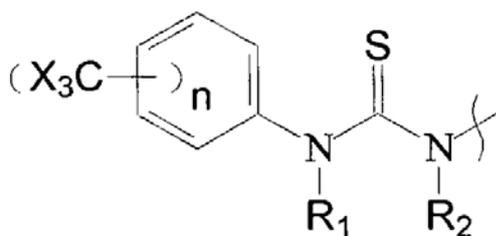
pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada.

También puede haber otros anillos presentes, tal como se indica a través de los ejemplos de estructuras que se proporcionan a continuación. Los grupos R son los indicados anteriormente para R₁-R₇ e Y es oxígeno o azufre.

5

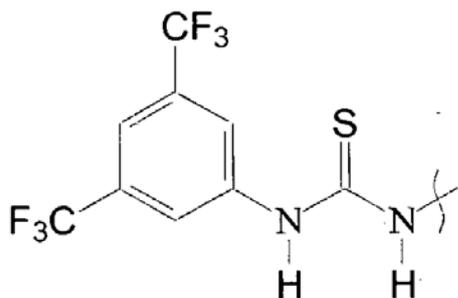


A continuación se representa una subclase concreta de tioureas.

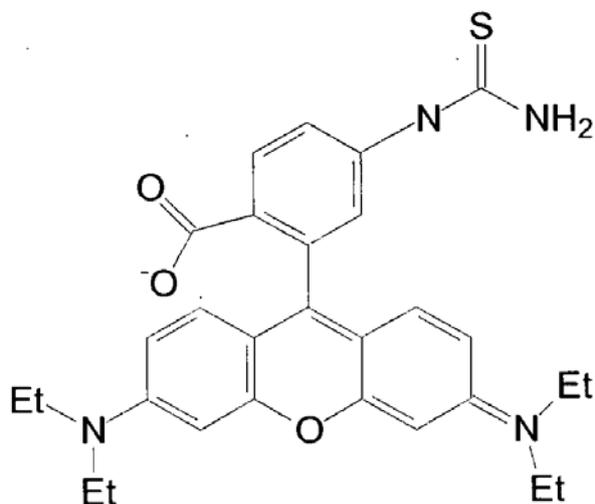


10 Con respecto a esta fórmula general, n es 1 a 5, típicamente 1-2, R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno o alquilo inferior, y X es independientemente un haluro o combinaciones de diferentes haluros.

A continuación se proporciona un ejemplo de una realización operativa de una feniltiourea.



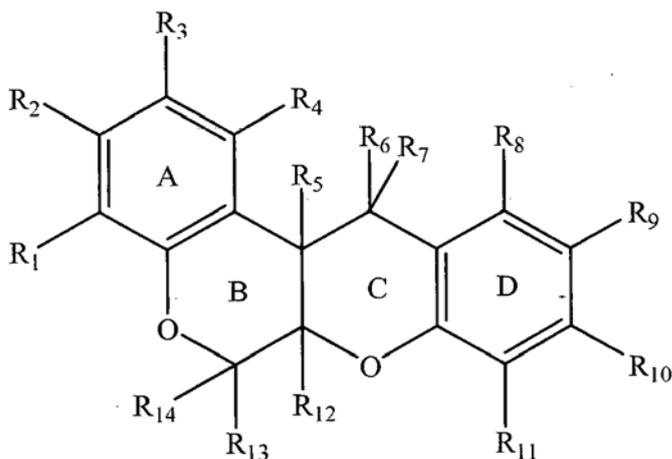
15 Los grupos trifluorometilo se muestran en las posiciones 2 y 4 con respecto a la fracción de tiourea. Un experto en la técnica apreciará que los compuestos que tienen todas las posiciones relativas para compuestos disustituídos, como 2,3, y los compuestos que tienen más de dos sustituyentes de trihaloalquilo, en todas las posiciones relativas posibles de estos diversos sustituyentes de trihaloalquilo, también se encuentran incluidos en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. Un ejemplo concreto de tiourea de rodamina tiene la fórmula siguiente.



6. Rotenonas

5

Los haptenos de rotenona y basados en rotenona, denominados colectivamente rotenoides, proporcionan otra clase de haptenos incluida en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una primera fórmula general para los haptenos de rotenona y basados en rotenona.



- 10 Varias publicaciones tratan sobre rotenoides naturalmente presentes, semisintéticos y sintéticos que resultan útiles para describir el género de rotenoides útiles para la práctica de la presente divulgación, entre las que se incluyen las siguientes: Leslie Crombie y Donald Whiting, *Biosynthesis in the Rotenoids Group of Natural Products: Application of Isotope Methodology*, *Phytochemistry*, 49, 1479-1507 (1998); y Nianbai Fang, y John Casida, *Cube Resin Insecticide: Identification and Biological Activity of 29 Rotenoid Constituents*; quedando cada una de ellas
- 15 incorporada al presente por referencia. Basándose en la presente divulgación y las realizaciones operativas de la misma, así como en las divulgaciones proporcionadas por estas publicaciones previas, y con respecto a la primera fórmula general, R_1 - R_{14} se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, aldehído, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, p.ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos
- 20 átomos de carbono e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p.ej., $-CX_3$ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), amino, aminoácido, amido, ciano (-CN), halógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), éter de oxima (p.ej., metoximina, $CH_3-O-N=$) hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior, carbonilo, ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrido, sulfonilo, sulfóxido, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I),
- 25 éster, éster de alquilo, acilo, exometileno, éter, cíclico, heterocíclico, arilo, aril alquilo, como bencilo, heteroarilo, polisacáridos, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes de R_1 - R_{14} también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado con los compuestos

que tienen la fórmula general mostrada. Al menos uno de los sustituyentes de R₁-R₁₄ también está unido a un conector o a una molécula vehículo.

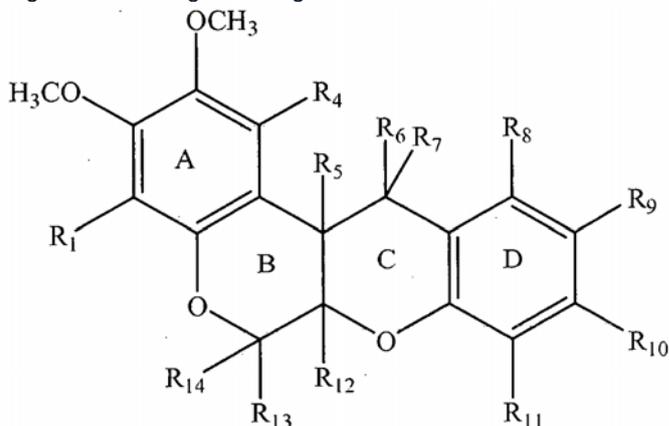
A pesar de que R₆ y R₇ pueden ser los indicados anteriormente, los sustituyentes más típicos son independientemente hidrógeno, OR₁₅, donde R₁₅ es hidrógeno, alifático, alifático sustituido, típicamente alquilo, alquilo sustituido e incluso más típicamente alquilo inferior y alquilo inferior sustituido, como haluros de alquilo inferior, cíclico, heterocíclico, arilo y heteroarilo, -NR₂₁, donde R₂₁ es hidrógeno, alifático, alifático sustituido, típicamente alquilo, alquilo sustituido e incluso más típicamente alquilo inferior y alquilo inferior sustituido, como haluros de alquilo inferior, cíclico, heterocíclico, arilo y heteroarilo, o N-L-RG, donde L es un conector o un grupo reactivo, como amina, tal y como se debate más detalladamente en el presente.

- 5
- 10

El anillo B puede incluir al menos un sitio de insaturación adicional. Por ejemplo, R₅ y R₁₂ pueden formar un doble enlace.

- 15

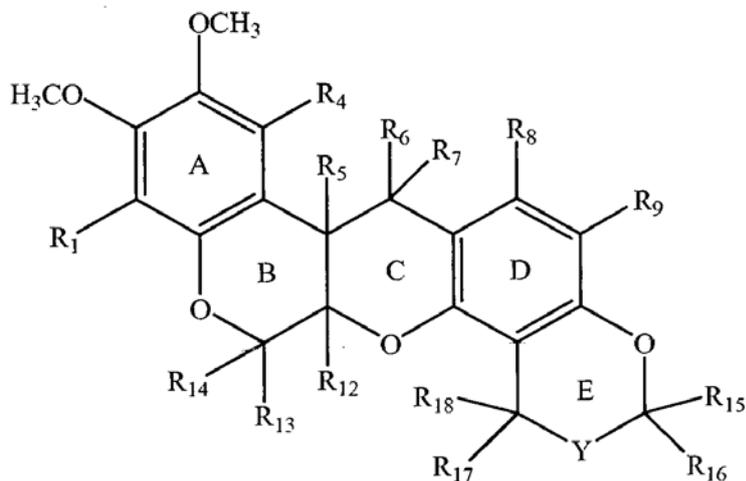
Determinados ejemplos de haptenos basados en rotenona de la presente divulgación también satisfacen típicamente la segunda fórmula general siguiente.



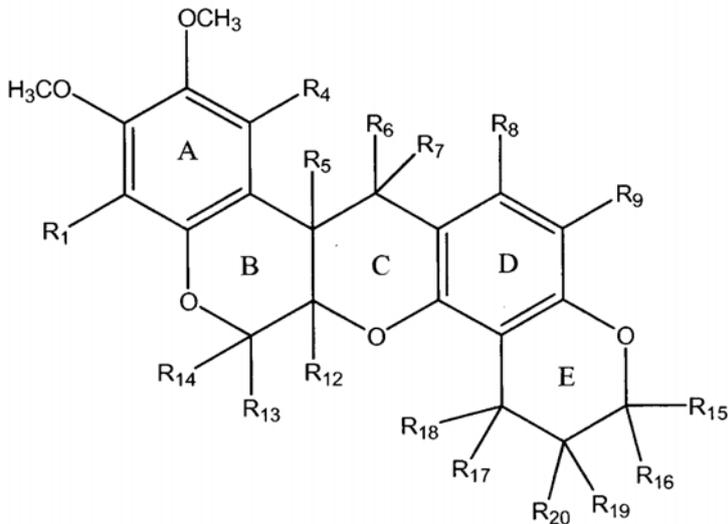
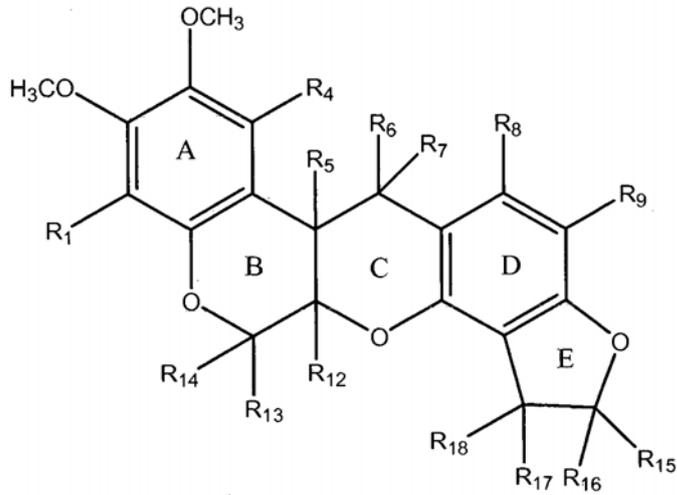
- 20

R₁₀ y R₁₁ pueden estar unidos en un anillo de 5 o 6 miembros, como furano o pirano, y más concretamente un anillo de furano o pirano insaturado y/o sustituido. Por tanto, a continuación se proporciona una tercera fórmula general útil para describir determinados haptenos basados en rotenona de la presente divulgación, donde los sustituyentes R son los anteriormente indicados.

25



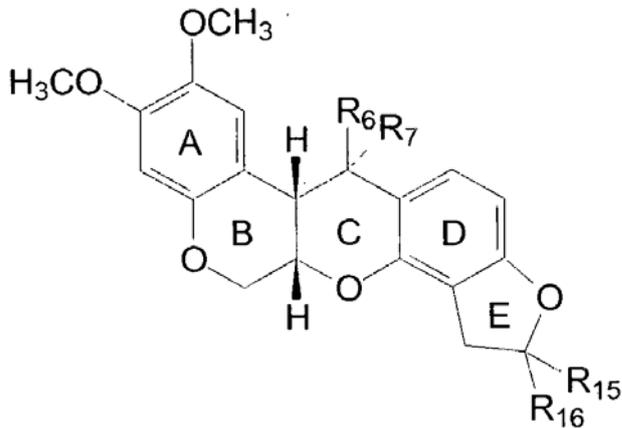
Y es un enlace, que define por tanto un anillo de 5 miembros, o es un átomo de carbono de un anillo de 6 miembros que contienen los sustituyentes R₁₉ y R₂₀, como se muestra a continuación, donde los sustituyentes R son los anteriormente indicados.



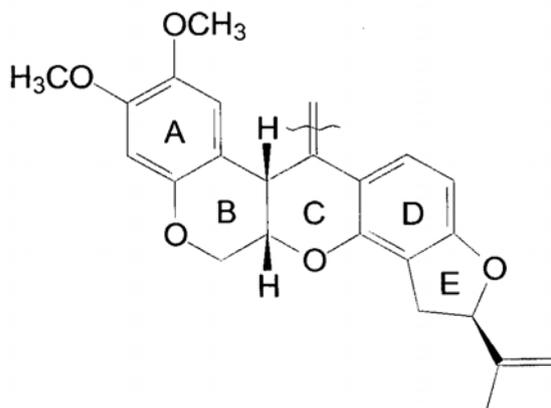
R₅ y R₁₂ en el punto de union del anillo se muestran sin indicar una estereoquímica concreta. El compuesto naturalmente presente tiene un punto de unión en el anillo cis, aunque las mezclas racémicas también resultan útiles para la práctica de la presente invención. Por otra parte, el estereoisómero trans probablemente se equilibra de forma rápida para formar la mezcla racémica.

5

Las realizaciones operativas de compuestos de esta clase satisfacen más típicamente la tercera fórmula general siguiente.

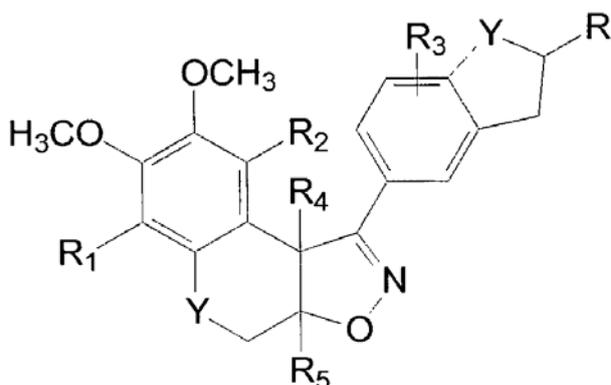


5 Con respecto a esta fórmula general, R₆ y R₇ son hidrógeno, alquilo o definen un enlace doble, como un enlace doble con oxígeno para formar un carbonilo. R₁₅ y R₁₆ son independientemente hidrógeno y alifático, típicamente alifático inferior, como alquenoilo, como por ejemplo isopreno, tal como se muestra a continuación.



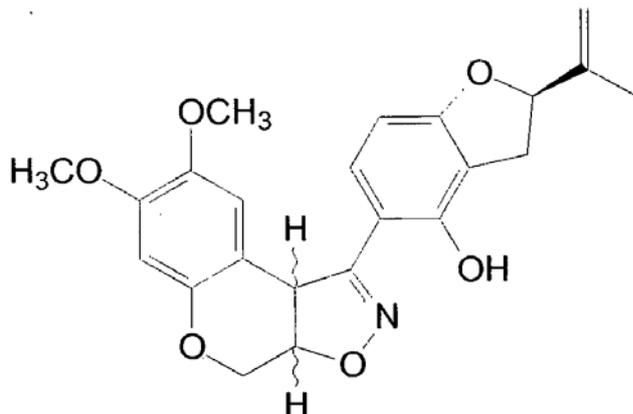
10 Una vez más, en la fórmula anterior se muestra un enantiómero concreto, aunque un experto en la técnica apreciará que el ámbito de aplicación de la presente divulgación no se limita a ese enantiómero concreto. En lugar de esto, todos los estereoisómeros que actúan como haptenos también se encuentran dentro del ámbito de aplicación de la divulgación. Todas las sustituciones anteriormente señaladas para esta clase de compuestos se aplican a este compuesto concreto. Otras sustituciones resultarán claramente evidentes para un experto en la técnica. Por ejemplo, los grupos metoxi del anillo A pueden ser cualquier compuesto de alcoxi, en particular los grupos alcoxi inferior. La unidad de isopreno también proporciona una olefina que se puede modificar sintéticamente, tal vez para proporcionar una posición alternativa, o al menos una segunda posición, para acoplar el hapteno a un conector o una molécula vehículo. Por ejemplo, la olefina se podría convertir en un alcohol mediante hidrobioración. También se podría convertir en un haluro o un epóxido para su uso como un hapteno o como intermedios útiles para la posterior transformación.

15 Una cuarta fórmula general para describir los haptenos basados en rotenona utilizados en la presente invención está particularmente dirigida a las isoxazolininas de rotenona, tal como se muestra a continuación.



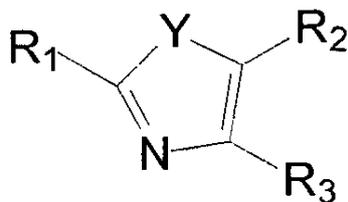
20 R-R₅ son, independientemente, hidrógeno, aldehído, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, incluyendo todos los isómeros de cadena ramificada, como isopreno, y todos los estereoisómeros, alifático sustituido, heteroalifático, p. ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos de carbono, como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p. ej., -CX₃ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), amino, aminoácido, amido, ciano (-CN), halógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), éter de oxima (p. ej., metoxamina, CH₃-O-N=), hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior, carbonilo, ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, carboxilo, carboxilato (y sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), éster, éster de alquilo, acilo, exometileno, éter, cíclico, heterocíclico, arilo, arilo alquilo, como bencilo, heteroarilo, polisacáridos, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes R-R₅ está unido a un conector o a una molécula vehículo. Y es oxígeno, nitrógeno o azufre.

A continuación se recoge una realización operativa concreta de un hapteno basado en rotenona que satisface esta cuarta fórmula general.



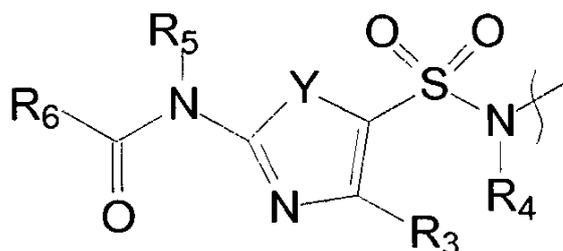
5 7. Oxazoles y tiazoles

Las sulfonamidas oxazol y tiazol proporcionan otra clase de haptenos dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general para sulfonamidas de oxazol y tiazol.



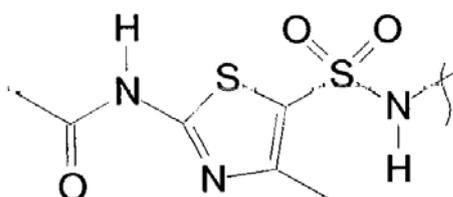
10 Con respecto a esta primera fórmula general, R_1 - R_3 se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, p. ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p. ej., $-CX_3$ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p. ej., metoxamina, $CH_3-O-N=$)
 15 alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano ($-CN$), éster, éster de alquilo, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima ($HO-N=$), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes R_1 - R_3 también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unidos o fusionados con los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos uno de los sustituyentes R_1 - R_3 está unido a un conector o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o una molécula vehículo. Y es oxígeno o azufre, típicamente azufre.

25 En determinados ejemplos de realizaciones operativas, R_1 ha sido amido, como los derivados de amida que se muestran a continuación. R_2 proporciona una posición para el acoplamiento a un conector o a una molécula vehículo, aunque las posiciones indicadas por R_1 y R_2 también proporcionan posiciones alternativas o adicionales para el acoplamiento a un conector y/o una molécula vehículo. En determinadas realizaciones operativas, R_2 ha sido $-SO_2$, y se ha utilizado para acoplar conectores formando una sulfonamida. Por tanto, a continuación se muestra una segunda fórmula general para realizaciones operativas de haptenos que ejemplifican esta clase de haptenos, donde
 30 los sustituyentes R_3 - R_6 e Y son los anteriormente indicados.

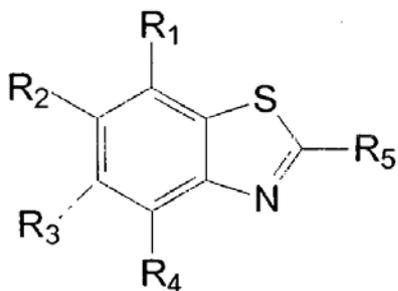


En determinadas realizaciones operativas, R_6 ha sido alquilo, particularmente alquilo inferior, como metilo, e Y ha sido azufre.

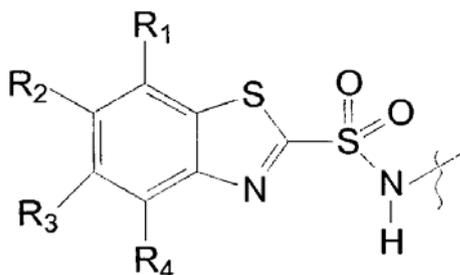
- 5 Una realización operativa de un compuesto de conformidad con esta clase de haptenos tenía la estructura química siguiente.



- 10 El tiazol u oxazol también podría formar parte de un sistema de anillo mayor. Por ejemplo, el oxazol o tiazol del anillo de 5 miembros se podría acoplar al menos a un anillo adicional, como un anillo de fenilo, tal como se indica a continuación.

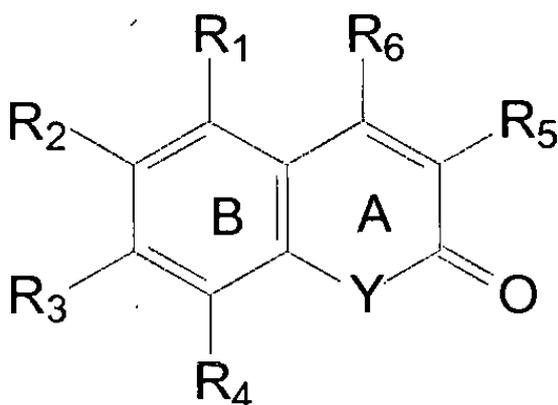


- 15 A pesar de que, en términos generales, los grupos R_1 - R_5 pueden ser los anteriormente mencionados, estos compuestos también pueden proporcionar una posición para el acoplamiento a un conector y/o a una molécula vehículo, como R_5 . A continuación se proporciona un posible derivado de sulfonamida.

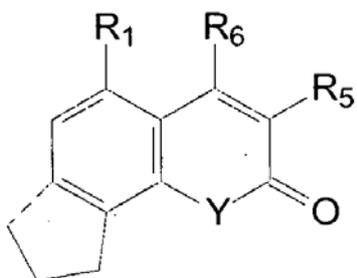
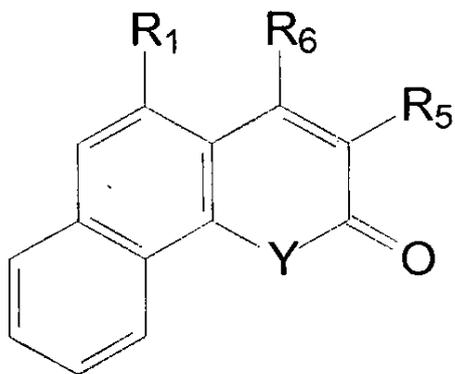
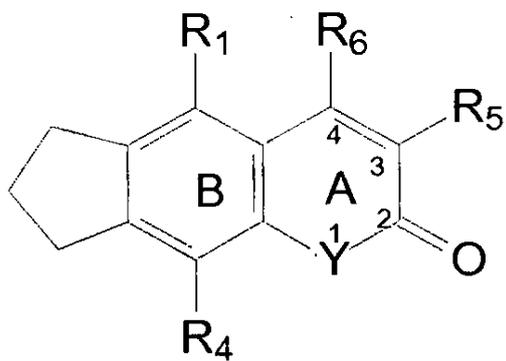
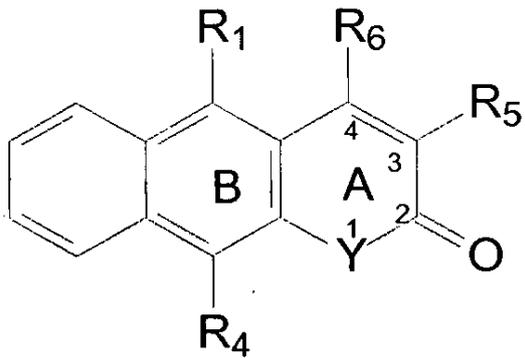


- 20 8. Cumarinas

La cumarina y derivados de la cumarina proporcionan otra clase de haptenos dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general para la cumarina y los derivados de cumarina.

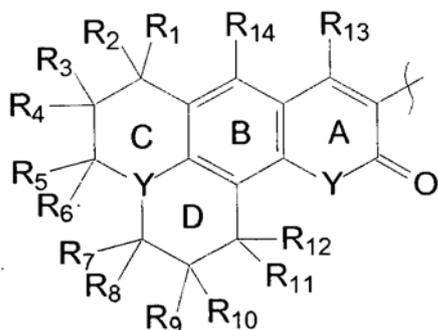


Con respecto a esta fórmula general, R_1 - R_6 se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, p. ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p. ej., $-CX_3$ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p. ej., metoxamina, $CH_3-O-N=$), alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil arilo, como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano ($-CN$), éster, éster de alquilo, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima ($HO-N=$), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes R_1 - R_6 también está típicamente unido a un conector o una molécula vehículo. Determinadas realizaciones operativas han usado la posición que se ha indicado que contiene un sustituyente R_5 para el acoplamiento a un conector o una molécula vehículo. La posición 4 puede ser importante si se usa la fluorescencia para detectar estos compuestos. Se cree que los sustituyentes distintos de hidrógeno en la posición 4 inhiben la fluorescencia, de forma que estos derivados pueden seguir siendo cromóforos. Y es oxígeno, nitrógeno o azufre. Dos o más de los sustituyentes R_1 - R_6 disponibles para la formación de estos compuestos también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido fusionado con los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. A continuación se proporcionan ejemplos de realizaciones de estos tipos de compuestos.



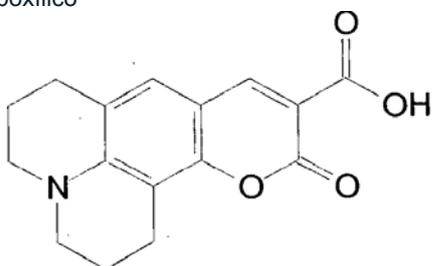
Un experto en la técnica apreciará que los anillos también podrían ser heterocíclicos y/o heteroarilos.

- 5 A las realizaciones operativas típicamente se fusionaron los sistemas de anillo A-D que tenían al menos una posición de acoplamiento de la molécula vehículo, con una posible posición de acoplamiento que se indica a continuación.

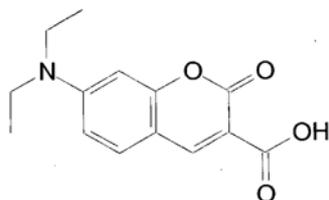


Con respecto a esta fórmula general, los grupos variables R e Y son los que se han indicado anteriormente. Más típicamente, R₁-R₁₄ son independientemente hidrógeno o alquilo inferior. Realizaciones concretas de haptenos basados en cumarina incluyen ácido 2,3,6,7-tetrahidro-11-oxo-1H,5H,11H-[1]benzopirano[6,7,8-ij]quinolizin-10-carboxílico

5



y dietil cumarina

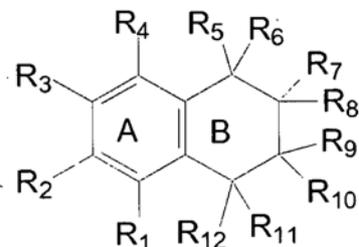


10

9. Ciclolignanos

Los compuestos basados en lignina, particularmente los ciclolignanos, como la podofilotoxina y derivados de la misma, proporcionan otra clase de haptenos incluidos en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una primera fórmula general para estos derivados basados en ciclolignina.

15



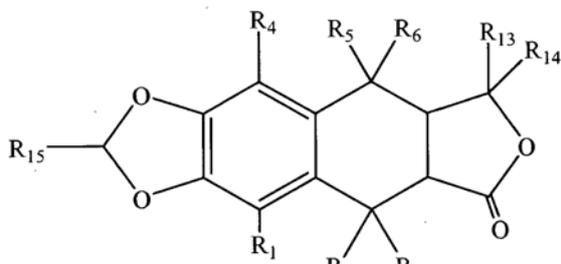
Diversas publicaciones tratan sobre los ciclolignanos naturalmente presentes, semisintéticos y sintéticos que resultan útiles para describir el género de los ciclolignanos útiles para la práctica de la presente divulgación, entre las que se incluyen las siguientes: Stephanie Desbene y Sylviane Giorgi-Renault, Drugs that Inhibit Tubulin Polymerization: The Particular Case of Podophyllotoxin and Analogues, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 2, 71-90 (2002); M. Gordaliza et al., Podophyllotoxin: Distribution, Sources, Applications and New Cytotoxic Derivatives, *Toxicol*, 44, 441-459 (2004); Philippe Meresse et al., Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry, *Current Medicinal Chemistry*, 11, 2443-2466 (2004); M. Pujol et al., Synthesis and Biological Activity of New Class of Dioxxygenated Anticancer Agents, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 5, 215-237 (2005); y Youngjae You, Podophyllotoxin Derivatives: Current Synthetic Approaches for New Anticancer Agents, *Current Pharmaceutical Design*, 11, 1695-1717 (2005); quedando cada una de ellas incorporada al presente por referencia. Basándose en la

20

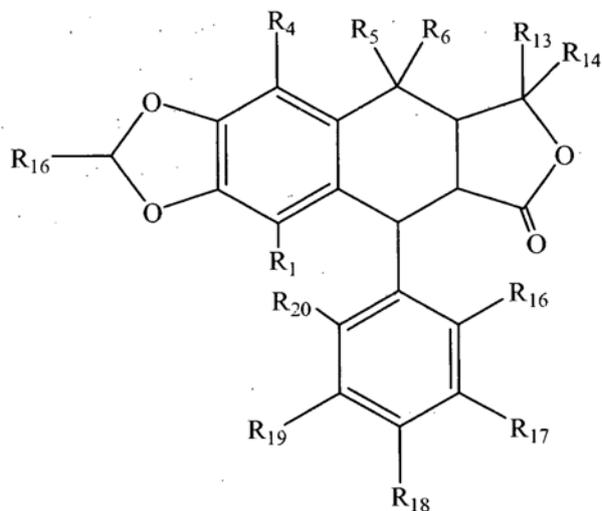
25

5 presente divulgación y las realizaciones operativas, así como en las divulgaciones proporcionadas por estas publicaciones previas, y en relación con esta primera fórmula general, R_1 - R_{12} se seleccionan típicamente entre hidrógeno, aldehído, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, p. ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p. ej., - CX_3 donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), amino, aminoácido, amido, ciano (-CN), halógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima, éter de oxima (p. ej., metoxamina, $CH_3-O-N=$), hidroxilo de alquilo, particularmente hidroxilo de alquilo inferior, carbonilo, ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), éster, éster de alquilo, acilo, exometileno, éter, cíclico, heterocíclico, arilo, alquil aril, como bencilo, heteroarilo, polisacáridos, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, y combinaciones de los mismos. Al menos uno de R_1 - R_{12} proporciona una posición para el acoplamiento del compuesto a un conector o molécula vehículo. Por otra parte, determinados grupos R pueden ser átomos en un sistema de anillo. Por ejemplo, R_2 y R_3 , así como dos de R_7 - R_{10} , se pueden unir en un sistema de anillo. Al menos uno de R_{12} y R_{11} también es a menudo un grupo arilo, como un anillo de benceno o un anillo de benceno sustituido.

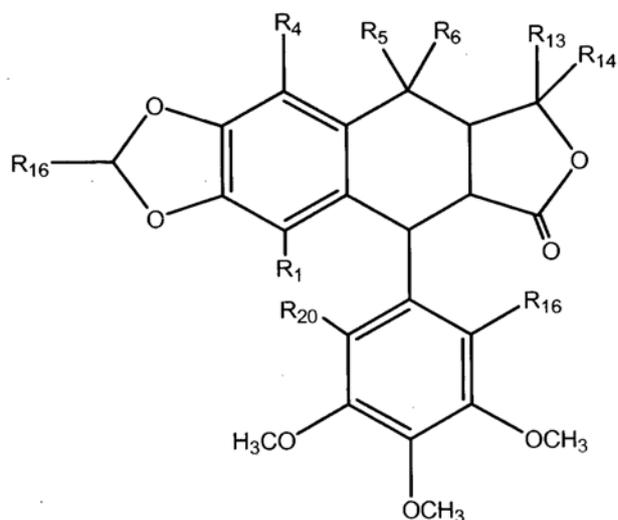
20 Determinadas realizaciones operativas también satisficieron la segunda fórmula general siguiente, donde los sustituyentes R son los anteriormente indicados.



Algunos ejemplos de compuestos donde al menos uno de R_{11} y R_{12} es un grupo arilo tienen la siguiente fórmula general, donde los sustituyentes R son los anteriormente mencionados.

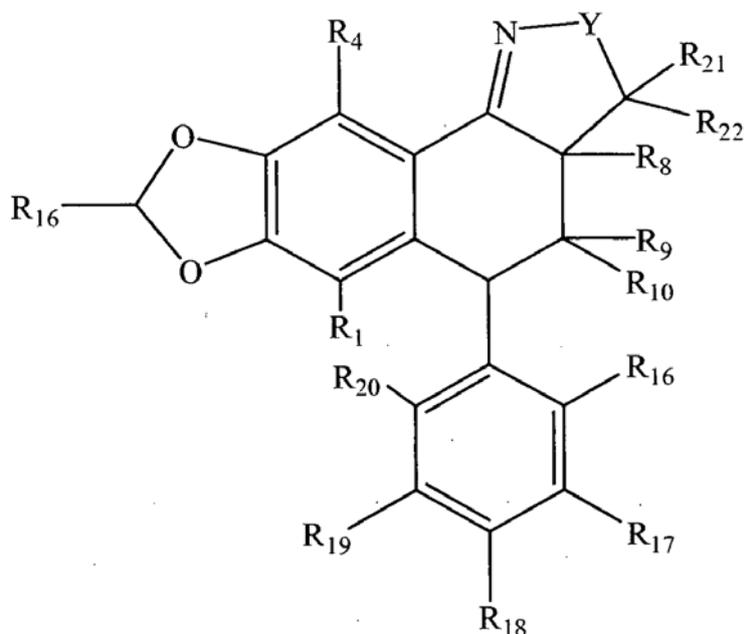


25 R_{16} - R_{20} son, por lo general, los anteriormente mencionados, aunque más típicamente son independientemente hidrógeno o alcoxi, típicamente alcoxi inferior, como metoxi, tal y como se muestra a continuación.

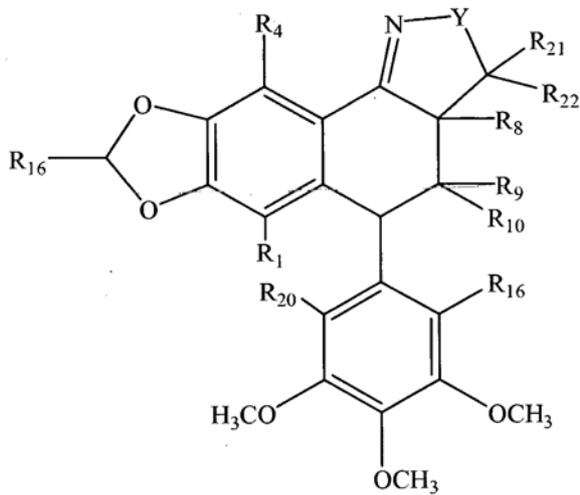


Al menos uno de los sustituyentes R se une típicamente a un conector, es un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con un conector, o es -L-RG. Por ejemplo, R₅ es a menudo -L-RG.

- 5 R₅ y R₆ también pueden formar un enlace doble, como un enlace doble con oxígeno para formar un grupo funcional carbonilo o un enlace doble con un átomo de nitrógeno para formar una imina. Determinados ejemplos de compuestos en los que R₅ y R₆ forman un enlace doble tenían la siguiente fórmula general, en la que los restantes sustituyentes R son los anteriormente mencionados. Y se selecciona entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Si Y es nitrógeno, entonces el átomo de nitrógeno también puede tener unido hidrógeno, o algún átomo, grupo funcional o fracción química distinta de hidrógeno. Por ejemplo, el nitrógeno puede tener un sustituyente alifático, como un grupo alquilo, un sustituyente arilo o heteroarilo, o un sustituyente arilo o heteroarilo sustituido, como un sustituyente arilo o heteroarilo sustituido, o un sustituyente alquil y/o alcoxi.

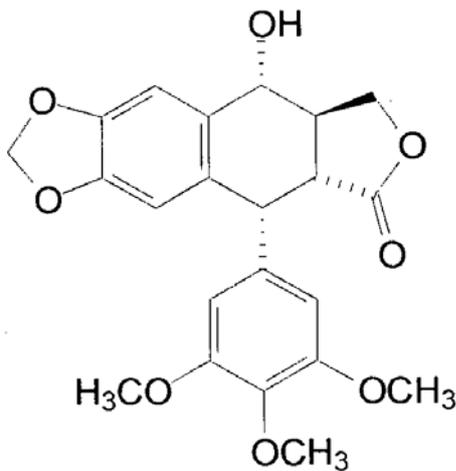


- 15 R₁₆-R₂₀ se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alcoxi, más típicamente alcoxi inferior, como metoxi, tal como se indica a continuación.



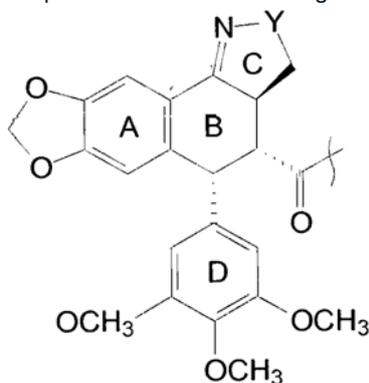
Como sucede con todos los conjugados de hapteno de la presente divulgación, al menos uno de los sustituyentes R está típicamente unido a un conector, es un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con un conector, es -L-RG o está directamente unido a un vehículo. Por ejemplo, R₉ es a menudo -L-RG.

- 5 A continuación se proporciona la estructura química de la podofilotoxina, un ejemplo de compuesto de esta clase de haptenos de los ciclolignanos.

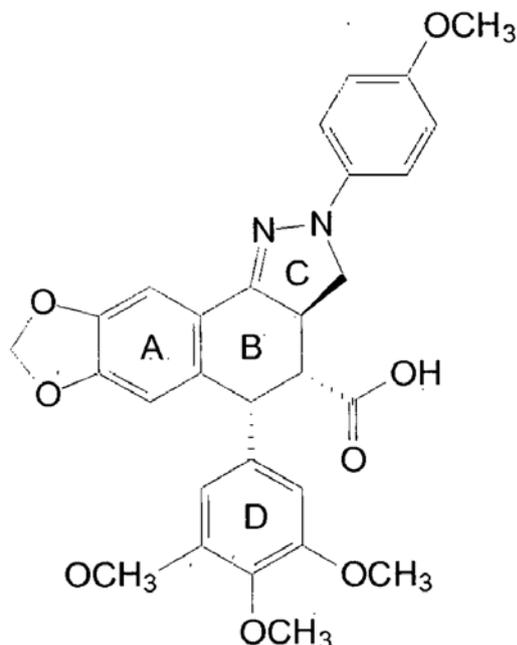


- 10 La podofilotoxina, también denominada podofilox, es una toxina no alcaloide con un peso molecular de 414,40 cuya fórmula es C₂₂H₂₂O₈. La podofilotoxina se encuentra presente a concentraciones del 0,3 al 1% en peso en el rizoma del podofilo (*Podophyllum peltatum*). El punto de fusión de la podofilotoxina es de 183,3-184 °C.

Por consiguiente, de acuerdo con la presente divulgación los ciclolignanos basados sustancialmente en la estructura de la podofilotoxina tienen la siguiente fórmula general, donde Y se selecciona entre nitrógeno, oxígeno o azufre.



- 15 A continuación se muestra un ejemplo concreto de un hapteno de ciclolignano de acuerdo con la presente invención.



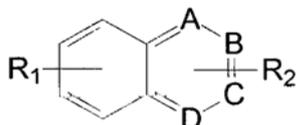
Este compuesto se produjo a partir de la podofilotoxina. El grupo hidroxilo de la podofilotoxina se oxidó para obtener una cetona. A continuación, se hizo reaccionar la cetona con una hidracina sustituida para producir el compuesto que se ha indicado anteriormente. El reactivo de la hidracina se puede sustituir como convenga, incluyendo los sustituyentes arilo y alifáticos.

5

10. Heterobiarilo

Otra clase general de hapteno de la presente divulgación son los compuestos de heterobiarilo, típicamente fenilquinolinas y quinoxalinas. Los compuestos de heterobiarilo divulgados tienen una primera fórmula química general como la que se recoge a continuación.

10



Con respecto a esta fórmula general, A-D se seleccionan entre carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, así como todas y cada una de las combinaciones de los mismos. Más típicamente, A-D son carbono o nitrógeno. Los sustituyentes R_1 - R_2 se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, p. ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p. ej., $-CX_3$ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p. ej., metoxamina, $CH_3-O-N=$), alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, alcoxi arilo, como metoxi y etoxi, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano ($-CN$), éster, éster de alquilo, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima ($HO-N=$), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más sustituyentes R_1 - R_2 , más típicamente una pluralidad de sustituyentes R_1 , también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado con los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos uno de los sustituyentes R_1 - R_2 está típicamente unido a un conector o directamente a un vehículo.

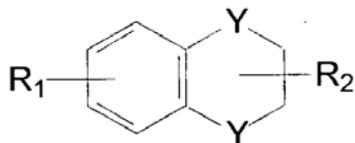
15

20

25

30

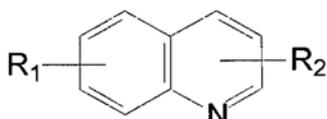
Determinadas realizaciones de los compuestos de heterobiarilo tienen la fórmula siguiente.



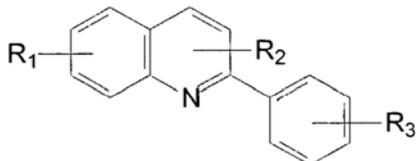
R_1 y R_2 son los indicados anteriormente para la primera fórmula general. Y es oxígeno, nitrógeno o azufre, típicamente nitrógeno. Si Y es nitrógeno, entonces la fórmula también puede incluir enlaces dobles con uno o más átomos de nitrógeno.

5

Los compuestos que tienen un único heteroátomo se ejemplifican mediante fenilquinolinas, como sigue.

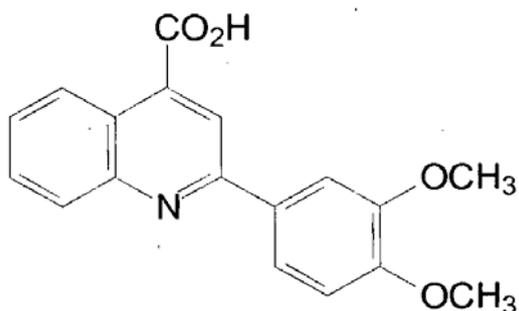


Otras realizaciones concretas incluyen haptenos arilo sustituidos, ejemplificados por la siguiente fórmula general.

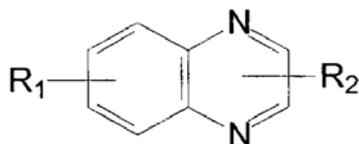


10

Por lo que respecta a esta fórmula general, R_1 - R_3 son los anteriormente indicados. Más concretamente, R_1 es hidrógeno, R_2 es acilo y R_3 es alcoxi. Un ejemplo concreto, ácido 2-(3,4-dimetoxifenil)quinolina-4-carboxílico, se proporciona a continuación.

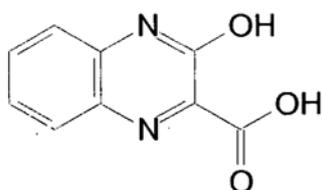


15 Los compuestos que tienen dos heteroátomos se representan mediante quinoxalinas, tal como se indica mediante la fórmula general siguiente.



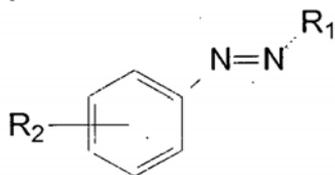
Un ejemplo concreto de un hapteno de biarilo-diheteroátomo de la presente divulgación se ejemplifica mediante 3-hidroxi-2-quinoxalincarbamida a continuación. Una vez más, los sustituyentes R_1 y R_2 son los anteriormente indicados con respecto a esta clase de haptenos.

20



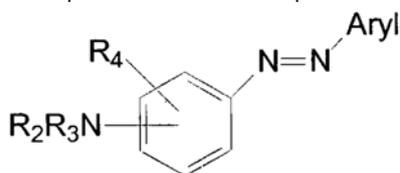
11. Azoarilo

Otra clase general de haptenos de la presente divulgación son los compuestos de azoarilo, como los azobencenos, que tienen una primera fórmula química general como la que se recoge a continuación.



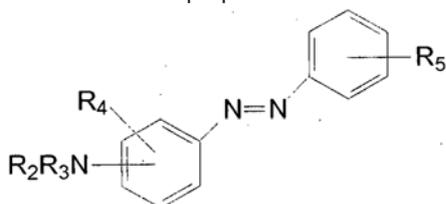
5 Los sustituyentes R₁-R₂ se seleccionan independientemente entre: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, p. ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p. ej., -CX₃ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p. ej., metoxamina, CH₃-O-N=), alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, alcoxi arilo, como metoxi y etoxi, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éster de alquilo, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más sustituyentes R₂ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado con los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Por ejemplo, dos sustituyentes R₂ pueden formar un anillo de fenilo fusionado o una estructura heterocíclica o heteroarílica fusionada.

Determinados compuestos de azoarilo divulgados tienen un primer sustituyente amina y un segundo sustituyente arilo. Típicamente estos compuestos tienen la fórmula siguiente.

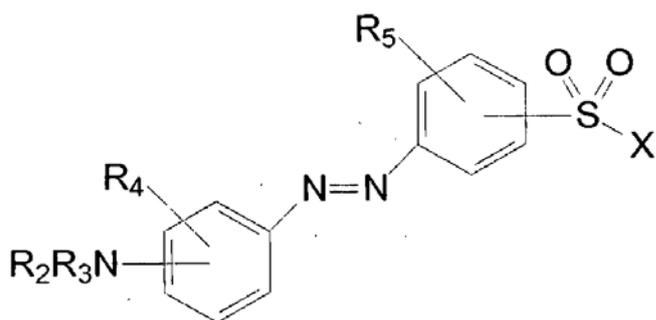


25 Con respecto a esta fórmula general, R₂-R₄ son los anteriormente indicados con respecto a esta clase de haptenos y determinadas realizaciones tienen R₂-R₃ alifático, concretamente alquilo, más concretamente alquilo inferior, y R₄ hidrógeno.

A continuación se proporciona una tercera fórmula general para describir los compuestos de azoarilo.

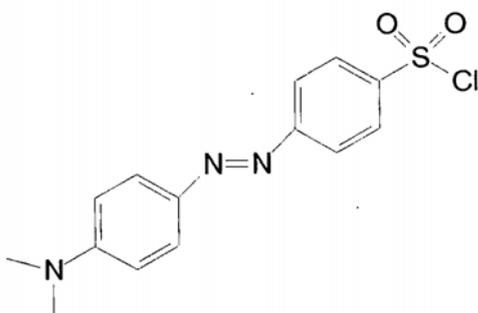


30 R₂-R₅ son los anteriormente indicados para esta clase concreta de haptenos. Al menos uno de R₂-R₅ define una posición para acoplar un conector o vehículo al hapteno de azoarilo, para formar un conjugado. Por ejemplo, R₅ puede ser un grupo funcional de haluro de sulfonilo. Los haluros de sulfonilo, como los que se muestran a continuación, son grupos funcionales útiles para acoplar conectores a los haptenos de azoarilo.



Con respecto a esta fórmula, R₂-R₅ son los indicados anteriormente. X es un haluro. Una realización concreta de estos haptenos de azoarilo, 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonil cloruro, tiene la fórmula que se proporciona a continuación.

5

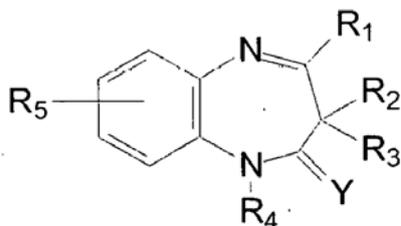


12.

Benzodiacepinas

Otra clase de haptenos de acuerdo con la presente invención son los haptenos de benzodiacepinas, que tienen una primera fórmula general como la que se indica a continuación.

10



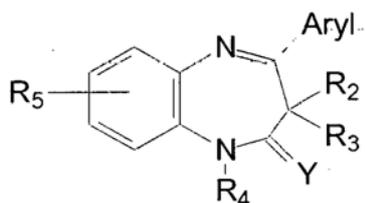
R₁-R₅ se seleccionan independientemente de: acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, particularmente alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, p. ej., cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, particularmente alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, como haluro de alquilo (p. ej., -CX₃ donde X es un haluro y combinaciones de los mismos, sea en la cadena o unidos), oxima, éter de oxima (p. ej., metoxamina, CH₃-O-N=), alcoholes (como alifático o hidroxilo alquilo, particularmente hidroxilo alquilo inferior), amido, amino, ácido amino, arilo, alquil aril, como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, como glucosa y fructosa, disacáridos, como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, como carboxilatos de iones de amonio o metal del Grupo I), cíclico, ciano (-CN), éster, exometileno, halógeno, heteroarilo, heterocíclico, hidrógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido y combinaciones de los mismos. Dos o más de los sustituyentes R₅ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado con los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos una de las posiciones R₁-R₅ está unida a un conector o está ocupada por un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o una molécula vehículo. R₁-R₅ son típicamente alifático, arilo, hidrógeno o hidroxilo, e incluso más típicamente alquilo, hidrógeno o fenilo. Y es oxígeno o azufre, más típicamente oxígeno.

15

20

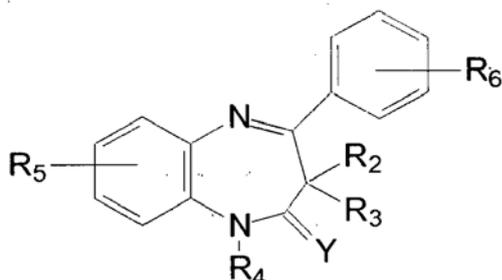
25

Determinadas realizaciones de los haptenos de benzodiacepina presentan R₁ arilo, tal como se indica a continuación.



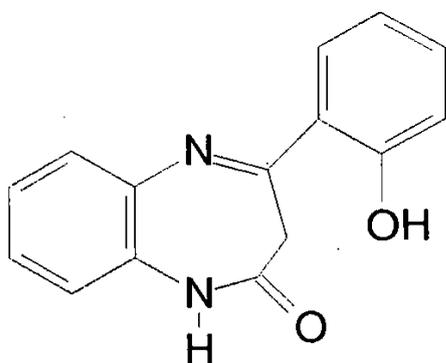
Para estas realizaciones, R_2 - R_5 son los anteriormente indicados para esta clase de haptenos; más típicamente estos sustituyentes se seleccionan independientemente entre alifático, particularmente alquilo, hidrógeno e hidroxilo.

5 Determinadas realizaciones divulgadas son compuestos de fenilo, tal como se ilustra a continuación.



Una vez más, R_2 - R_6 son los anteriormente indicados, aunque más típicamente estos sustituyentes se seleccionan independientemente entre alifático, particularmente alquilo, hidrógeno e hidroxilo. Determinadas realizaciones divulgadas son compuestos de fenilo, tal como se ilustra a continuación. Una realización concreta, 4-(2-hidroxifenil)-1H-benzo[b][1,4]diazepin-2(3H)-ona, se proporciona a continuación.

10



III. Conectores

1. General

15 Tal como indica la fórmula general, los conjugados de hapteno-conector opcional-vehículo de la presente divulgación pueden incluir conectores. Cualquier conector actualmente conocido para este fin, o que se desarrolle en el futuro, puede ser empleado en la presente invención mediante su acoplamiento a los haptenos divulgados en el presente. Los conectores útiles pueden ser homo o heterobifuncionales, aunque más típicamente son heterobifuncionales.

20 2. Alifático

A título únicamente enunciativo y sin carácter limitador, una primera clase de conectores adecuados para formar los conjugados de hapteno divulgados son los compuestos alifáticos, como las cadenas de hidrocarburo alifático que disponen de uno o más sitios de insaturación, o las cadenas de alquilo. La cadena alifática también incluye típicamente los grupos funcionales terminales, incluyendo a título meramente enunciativo y sin carácter limitador, un grupo carbonilo reactivo, un grupo amina reactivo, un grupo tiol reactivo o un grupo foto reactivo, que facilitan el acoplamiento a haptenos y a otros compuestos deseados, como fracciones de unión específica. La longitud de la cadena puede variar, aunque típicamente tiene un límite práctico máximo de unos 30 átomos. Los enlaces de la cadena de más de 30 átomos de carbono han demostrado ser menos efectivos que los compuestos con enlaces de cadena más pequeños. Por tanto, los conectores de la cadena alifática tienen una longitud de cadena de entre 1 y 30 átomos de carbono aproximadamente. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que, si un conector en

30

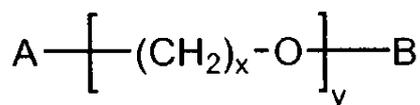
concreto tiene más de 30 átomos y funciona de forma eficaz para unir el hapteno a una unidad de acoplamiento de una molécula vehículo y el conjugado funciona como se esperaba, entonces estos enlaces continuarán estando dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación.

5 3. Óxidos de alquileo

Una segunda clase de conectores útiles para la práctica de la presente invención son los óxidos de alquileo. Los óxidos de alquileo están representados en el presente por referencia a los glicoles, como glicoles de etileno. Los conjugados de hapteno de la presente divulgación han demostrado resultar particularmente útiles si la hidrofiliía del conector se incrementa con respecto a sus cadenas de hidrocarburo. Como resultado, los óxidos de alquileo, como los glicoles, han resultado útiles para la práctica de la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que, a medida que aumenta el número de átomos de oxígeno, la hidrofiliía del compuesto también puede aumentar. Por tanto, los conectores de la presente divulgación tienen típicamente la fórmula $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$ donde n es entre 2 y 15 aproximadamente, aunque más concretamente entre 2 y 8 aproximadamente.

15 Los conectores de polialquilenglicol heterobifuncionales útiles para la práctica de determinadas realizaciones de la presente divulgación se describen en las solicitudes copendientes del beneficiario, entre las que se incluyen "Nanoparticle Conjugates," Solicitud de patente estadounidense nº 11/413.778, presentada el 28 de abril de 2006 ; "Antibody Conjugates," Solicitud de patente estadounidense nº 11/413.415, presentada el 27 de abril de 2006 ; y "Molecular Conjugate," Solicitud de patente provisional estadounidense nº 60/739.794, presentada el 23 de noviembre de 2005 ; quedando todas estas solicitudes incorporadas al presente por referencia. Un experto en la técnica apreciará que los conectores divulgados en estas solicitudes se pueden utilizar para unir fracciones de unión específica, fracciones generadoras de señales y haptenos en todas y cada una de las combinaciones deseadas. Los conectores de polialquilenglicol heterobifuncionales se divulgan a continuación, y su uso se ejemplifica por referencia al acoplamiento de fracciones de unión específica, tales como anticuerpos y ácidos nucleídos, a haptenos y etiquetas detectables. En concreto, a continuación se exponen ejemplos de conjugados de anticuerpos anti-hapteno y etiquetas detectables, y conjugados de anticuerpos primarios o ácidos nucleicos con haptenos.

Una realización concreta de un conector para su uso con los conjugados divulgados es un conector de polialquilenglicol heterobifuncional que tiene la estructura general que se muestra a continuación:



30 donde "A" y "B" incluyen diferentes grupos reactivos, "x" es un número entero entre 2 y 10 (como 2, 3 o 4) e "y" es un número entero entre 1 y 50; por ejemplo, entre 2 y 30, como entre 3 y 20 o entre 4 y 12. Uno o más átomos de hidrógeno se pueden sustituir en otros grupos funcionales, como grupos hidroxilo, grupos alcoxi (como metoxi y etoxi), átomos de halógeno (F, Cl, Br, I), grupos sulfato y grupos amino (incluyendo grupos amino monosustituídos y disustituídos, como grupos dialquil amino).

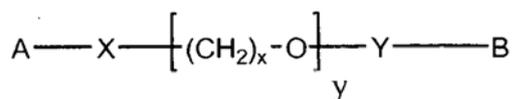
35 A y B del conector pueden incluir independientemente un grupo carbonil reactivo, un grupo amina reactivo, un grupo tiol reactivo o un grupo foto reactivo, pero no son los mismos. Algunos ejemplos de grupos carbonil reactivos incluyen los grupos aldehído y cetona reactivos, como derivados de hidracina y aminas. Algunos ejemplos de grupos amina reactivos incluyen ésteres activos como NHS o sulfo-NHS, isotiocianatos, isocianatos, acil azidas, cloruros de sulfonilo, aldehídos, glioxales, epóxidos, oxiranos, carbonatos, haluros de arilo, imidoésteres, anhídridos y similares. Algunos ejemplos de grupos tiol reactivos incluyen aceptores de Michael no polimerizables, grupos haloacetilo (como yodoacetilo), haluros de alquilo, maleimidias, aziridinas, grupos acrililoil, sulfonas de vinilo, benzoquinonas, grupos aromáticos que se pueden someter a sustitución nucleofílica, como grupos de fluorobenceno (como grupos de tetrafluorobenceno y pentafluorobenceno) y grupos de disulfuro, tales como grupos de disulfuro de piridilo y tioles activados con reactivo de Ellman. Algunos ejemplos de grupos foto reactivos incluyen aril azidas y aril azidas halogenadas. Alternativamente, A y/o B puede ser un grupo funcional que reacciona con un tipo de grupo reactivo específico. Por ejemplo, A y/o B puede ser un grupo amina, un grupo tiol o un grupo que contiene carbonilo que reacciona con su correspondiente grupo reactivo (como un grupo amina reactivo, grupo tiol reactivo o grupo carbonilo reactivo, respectivamente) que ha sido introducido o se encuentra de otro modo presente en un hapteno y/o vehículo. Otros ejemplos de estos tipos de grupos resultarán evidentes para un experto en la técnica. Otros ejemplos e información sobre las condiciones de reacción para el intercambio de un tipo de grupo reactivo por otro se proporcionan en Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press, San Diego, 1996, que se incorpora al presente por referencia. En una realización concreta, un grupo tiol reactivo es distinto de sulfona de vinilo.

55 En algunas realizaciones, un grupo tiol reactivo del conector heterobifuncional está covalentemente unido a una fracción de unión específica y un grupo amina-reactivo del conector heterobifuncional está covalentemente unido a un grupo amina reactivo de un derivado de hapteno (como un éster activado que se ha formado haciendo reaccionar un grupo de ácido carboxílico con SMCC), la nanopartícula o viceversa. Por ejemplo, un grupo tiol reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente a un residuo de cisteína (como tras la reducción de los

puentes de cistina) de la fracción de unión específica o un grupo tiol reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente a un grupo tiol que se introduce en la fracción de unión específica, y el grupo amina reactivo se une al derivado de hapteno activado que tiene un grupo amina reactivo, como un éster activado. Cuando el conjugado incluye un anticuerpo anti-hapteno conjugado con una etiqueta detectable, un grupo tiol reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente con el anticuerpo y un grupo amina reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente con el anticuerpo y un grupo amina reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente con la etiqueta detectable, o viceversa.

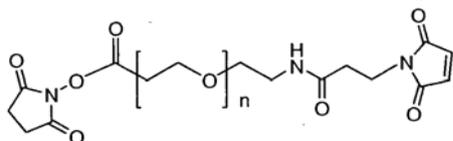
Alternativamente, un grupo aldehído reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente a una fracción de unión específica y un grupo funcional o bien un grupo reactivo diferente del conector se une a un hapteno. Cuando la fracción de unión específica es un anticuerpo anti-hapteno y el anticuerpo se conjuga con una etiqueta detectable, un grupo aldehído reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente con el anticuerpo y un grupo amina-reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente con la etiqueta detectable, o viceversa. En una realización concreta, un grupo aldehído reactivo del conector heterobifuncional se puede unir covalentemente con un aldehído formado en una porción glicosilada de un anticuerpo anti-hapteno, y un grupo amina reactivo del conector se une a la etiqueta detectable. En otras realizaciones, un grupo aldehído reactivo del conector heterobifuncional se une covalentemente al anticuerpo anti-hapteno y un grupo tiol reactivo del conector heterobifuncional se une a la etiqueta detectable, o viceversa. En otras realizaciones más, un grupo aldehído reactivo del conector heterobifuncional se une covalentemente a la fracción de unión específica y un grupo tiol reactivo del conector heterobifuncional se une a la nanopartícula, o viceversa.

En algunas realizaciones, el conector heterobifuncional tiene la fórmula siguiente:



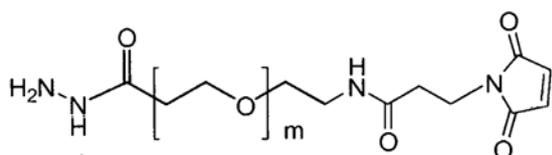
donde "A" y "B" son grupos reactivos diferentes y son los anteriormente mencionados; "x" e "y" son los anteriormente mencionados; y "X" e "Y" son grupos separadores adicionales, por ejemplo, grupos separadores que tienen entre 1 y 10 carbonos, como entre 1 y 6 carbonos o entre 1 y 4 carbonos, y opcionalmente contienen uno o más enlaces de amida, enlaces de éter, enlaces de éster y similares. Los separadores "X" e "Y" pueden ser iguales o diferentes, y pueden ser de cadena lineal, ramificada o cíclica (por ejemplo, estructuras cíclicas alifáticas o aromáticas) y pueden ser sustituidos o no sustituidos. Los grupos funcionales que pueden ser sustituyentes de un separador incluyen grupos carbonilo, grupos hidroxilo, átomos de halógeno (F, Cl, Br e I), grupos alcoxi (como metoxi y etoxi), grupos nitro y grupos sulfato.

En realizaciones concretas, el conector heterobifuncional comprende un conector de glicol de polietileno heterobifuncional que tiene la fórmula siguiente:



donde n = 1 a 50, por ejemplo, n = 2 a 30, como, por ejemplo, n = 3 a 20 o n = 4 a 12. En realizaciones más concretas, un carbonilo de un grupo succinimida de este conector está covalentemente unido a un grupo amina de una etiqueta detectable y un grupo maleimida del conector está covalentemente unido a un grupo tiol de un anticuerpo anti-hapteno, o viceversa. En otras realizaciones más concretas, una media de aproximadamente entre 1 y 10 fracciones de unión específica están covalentemente unidas a una nanopartícula, como nanocristales semiconductores (como quantum dots adquiridos, por ejemplo, a Invitrogen Corp., Eugene, OR; véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses nº 6.815.064 , 6.682.596 y 6.649.138, quedando cada una de estas patentes incorporadas al presente por referencia), nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas metálicas y nanopartículas superparamagnéticas.

En otras realizaciones concretas, el conector heterobifuncional comprende un conector de glicol de polietileno heterobifuncional que tiene la fórmula siguiente:

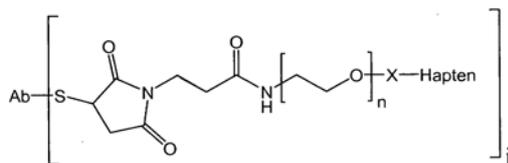


donde m = 1 a 50, por ejemplo, m = 2 a 30, como m = 3 a 20 o m = 4 a 12. En realizaciones más concretas, un grupo hidrazida del conector está unido covalentemente con un grupo aldehído de un anticuerpo anti-hapteno y un grupo maleimida del conector está unido covalentemente con un grupo tiol de una etiqueta detectable, o viceversa. En realizaciones todavía más concretas, el grupo aldehído de la fracción de unión específica es un grupo aldehído formado en una porción Fc de un anticuerpo anti-hapteno mediante oxidación de una región glicosilada de la porción Fc del anticuerpo. En otras realizaciones todavía más concretas, una media de aproximadamente entre 1 y 10

anticuerpos anti-hapteno están unidos covalentemente con una nanopartícula. Dicho brevemente, los conectores PEG de maleimida/hidrazida de la fórmula anterior se pueden sintetizar a partir de los correspondientes conectores PEG de éster activo/maleimida (comercializados, por ejemplo, por Quanta Biodesign, Powell, OH) mediante tratamiento con un derivado de hidrazina protegido (como hidrazina protegida por Boc) seguido de un tratamiento con ácido.

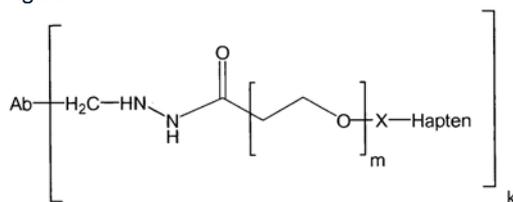
Se proporciona un conjugado de una fracción de unión específica (SBM) y uno o más de los haptenos divulgados. La SBM de estos conjugados puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo, un ácido nucleico, una lectina o una avidina, como estreptavidina. Si la SBM incluye un anticuerpo, el anticuerpo se puede unir específicamente a cualquier molécula concreta o a cualquier grupo concreto de moléculas altamente similares, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína concreta que puede estar presente en una muestra. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-anticuerpo que se puede utilizar como un anticuerpo secundario en un inmunoensayo. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender un anticuerpo anti-IgG, como un anticuerpo anti-IgG de ratón, un anticuerpo anti-IgG de conejo o un anticuerpo anti-IgG de cabra.

En determinadas realizaciones, un conjugado de anticuerpo divulgado tiene la fórmula siguiente:



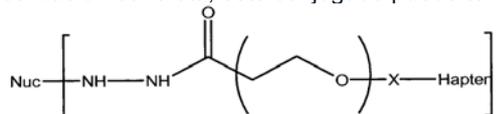
donde Ab es un anticuerpo, $n = 1$ a 50 (como $n = 2$ a 30, $n = 3$ a 20 o $n = 4$ a 12) y $j = 1$ a 10 (como $j = 2$ a 6 o $j = 3$ a 4). X es un grupo separador adecuado para separar el hapteno del resto del conjugado y que permite que el hapteno se acople con el resto del conjugado. Por ejemplo, un grupo separador puede ser un grupo alifático o aromático, típicamente un grupo alifático, e incluso más típicamente un grupo alquilo o alquilo sustituido que tiene entre aproximadamente 1 y 10 átomos de carbono, como entre 1 y 6 átomos de carbono o entre 1 y 4 átomos de carbono. El separador también puede incluir átomos diferentes del carbono, como heteroátomos, incluyendo, a título meramente enunciativo, haluros, nitrógeno, oxígeno, azufre y combinaciones de los mismos. Estos átomos adicionales pueden definir grupos funcionales. Por ejemplo, el grupo separador puede incluir opcionalmente uno o más conectores de amida, conectores de éter, conectores de éster, conectores de amina y similares. La estructura del separador dependerá de la química utilizada para acoplar el hapteno al conector, y más adelante se abordan ejemplos específicos de estos conectores con respecto a haptenos específicamente divulgados, aunque, en términos generales, el grupo X puede formarse, por ejemplo, haciendo reaccionar una amina del conector con un grupo reactivo de amina añadido al hapteno (o viceversa) o un carbonilo del conector con un grupo reactivo del carbonilo añadido al hapteno (o viceversa).

Alternativamente, un conjugado de un anticuerpo con uno o más de los haptenos divulgados puede tener la fórmula siguiente:



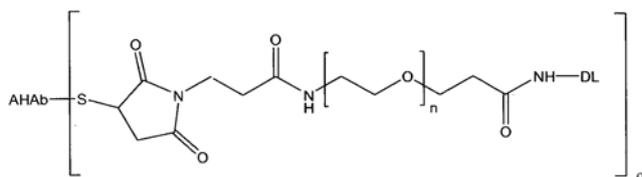
donde Ab es un anticuerpo, $m = 1$ a 50 (como $m = 2$ a 30, $m = 3$ a 20 o $n = 4$ a 12) y $k = 1$ a 10 (como $k = 2$ a 6 o $kj = 3$ a 4) y X es de nuevo un grupo separador, como un grupo separador que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, por ejemplo, entre 1 y 6 átomos de carbono o entre 1 y 4 átomos de carbono, y que opcionalmente contiene uno o más conectores de amida, conectores de éter, conectores de éster, conectores de amina y similares.

En otras realizaciones, la fracción de unión específica unida a uno o más haptenos es un ácido nucleico. En una realización concreta, este conjugado puede tener la fórmula siguiente:

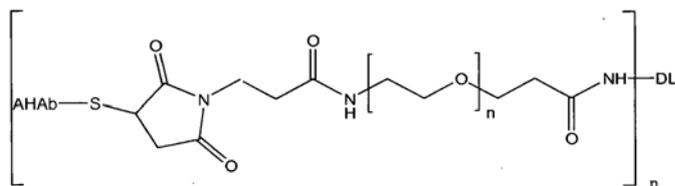


donde Nuc es cualquier complejo que contiene una base de ácido nucleico, incluyendo un nucleósido, nucleótido, fosfato de nucleótido (como trifosfato de nucleótido), un oligonucleótido, un polinucleótido, y m puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y 500, como $m = 1$ a 100 o $m = 1$ a 50) y X es una vez más un grupo separador, por ejemplo, un grupo separador que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, como entre 1 y 6 átomos de carbono o entre 1 y 4 átomos de carbono, y opcionalmente contiene uno o más enlaces de amida, enlaces de éter, enlaces de éster, enlaces de amida y similares.

También se proporciona un conjugado de un anticuerpo que se une específicamente a un hapteno divulgado. En realizaciones concretas, este conjugado puede tener la fórmula siguiente:

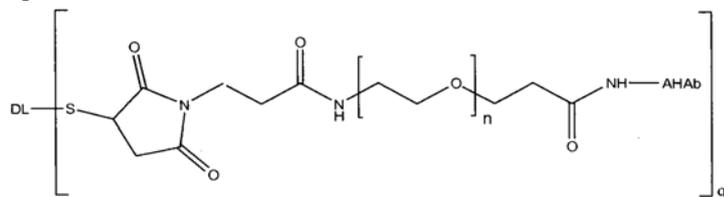


donde AHAb es un anticuerpo anti-hapteno, DL es una etiqueta detectable como una enzima, $n = 1$ a 50 (como, $n = 2$ a 30, $n = 3$ a 20 o $n = 4$ a 12) y $o = 1$ a 10 (como, $o=2$ a 6 o $o=3$ a 4); o

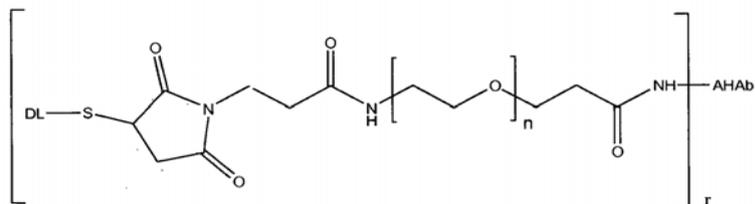


5 donde AHAb es un anticuerpo anti-hapteno, DL es una etiqueta detectable, como una nanopartícula, $n = 1$ a 50 (como, $n = 2$ a 30, $n = 3$ a 20 o $n = 4$ a 12) y $p = 1$ a 10 (como, $p = 2$ a 6 o $p = 3$ a 4).

[0185] En otras realizaciones concretas más, un conjugado divulgado comprende un conjugado que tiene la fórmula siguiente:

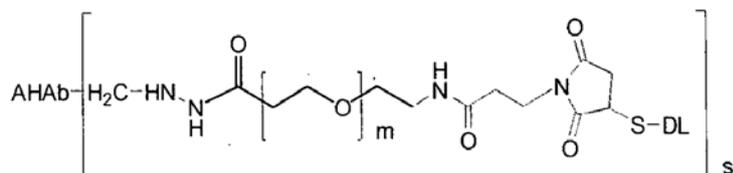


10 donde AHAb es un anticuerpo anti-hapteno, DL es una etiqueta detectable, como una nanopartícula, $n = 1$ a 50 (como, $n = 2$ a 30, $n = 3$ a 20 o $n = 4$ a 12) y $q = 1$ a 10 (como, $q=2$ a 6 o $q=3$ a 4); o

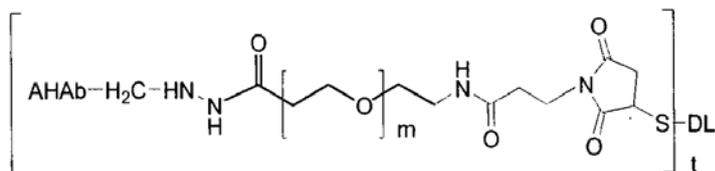


15 donde AHAb es un anticuerpo anti-hapteno, DL es una etiqueta detectable, como una enzima y $n = 1$ a 50 (como, $n = 2$ a 30, $n = 2$ a 20 o $n = 4$ a 12) y $r = 1$ a 10 (como $r=2$ a 6 o $r=3$ a 4).

En otras realizaciones concretas más, un conjugado de nanopartícula-fracción de unión específica heterobifuncional unido con PEG comprende un conjugado que tiene la fórmula siguiente:

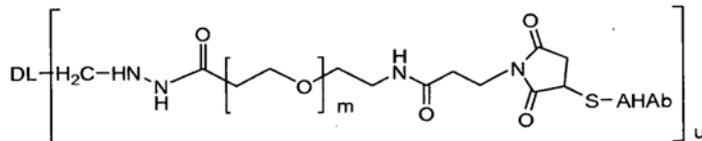


20 donde AHAb es un anticuerpo anti-hapteno, DL es una etiqueta detectable como una enzima, $m = 1$ a 50 (como, $m = 2$ a 30, $m = 3$ a 20 o $m = 4$ a 12) y $s = 1$ a 10 (como, $s=2$ a 6 o $s=3$ a 4); o

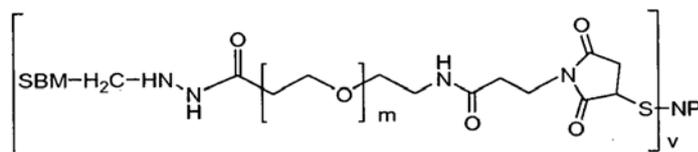


donde AHAb es un anticuerpo anti-hapteno, DL es una etiqueta detectable como una nanopartícula, $m = 1$ a 50 (como, $m = 2$ a 30, 2 a 20 o 4 a 12) y $t = 1$ a 10 (como, $t=2$ a 6 o $t=3$ a 4).

En otras realizaciones concretas más, un conjugado de nanopartícula-fracción de unión específica heterofuncional unido con PEG comprende un conjugado que tiene la fórmula siguiente:



donde AHAb es un anticuerpo anti-hapteno, DL es una etiqueta detectable, $m = 1$ a 50 (como, $m = 2$ a 30, $m = 3$ a 20 o $m = 4$ a 12) y $u = 1$ a 10 (como, $u = 2$ a 6 o $u = 3$ a 4); o



donde SBM es una fracción de unión específica, NP es una nanopartícula, $m = 1$ a 50 (como, $m=2$ a 30, $m=2$ a 20 o $m=4$ a 12) y $v=1$ a 10 (como, $v=2$ a 6 o $v= 3$ a 4).

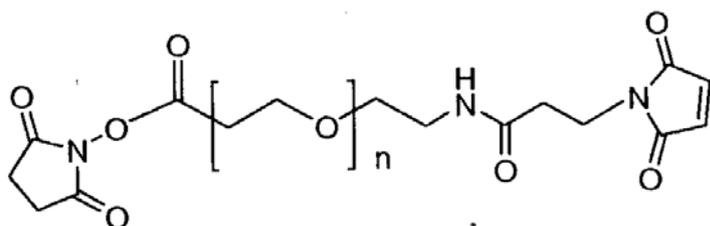
Los conjugados divulgados se pueden utilizar para detectar una o más moléculas de interés en una muestra biológica en cualquier tipo de ensayo, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos y ensayos de hibridación in situ. En una realización, los conjugados divulgados se utilizan como un anticuerpo etiquetado con hapteno en un inmunoensayo, por ejemplo, un anticuerpo primario etiquetado con hapteno dirigido a una molécula concreta que, a continuación, se pone en contacto con un conjugado de anticuerpo anti-hapteno que incluye una etiqueta detectable. Alternativamente, una sonda de ácido nucleico etiquetada con hapteno unida a un ácido nucleico diana se pone, a continuación, en contacto con un conjugado de anticuerpo anti-hapteno que incluye una etiqueta detectable. La muestra biológica puede ser cualquier muestra que contiene biomoléculas (como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hormonas, etc.), pero, en realizaciones concretas, la muestra biológica incluye una sección de tejido (por ejemplo, obtenido en una biopsia) o una muestra citológica (frotis de Papanicolaou o frotis de sangre). Otros tipos de ensayos en los que se pueden utilizar los conjugados divulgados resultarán evidentes para los expertos en la técnica y, a continuación, se recogen ejemplos concretos.

En otro aspecto, se divulga un método para preparar un conjugado de hapteno-fracción de unión específica. El método incluye la formación de una fracción de unión específica tiolada a partir de una fracción de unión específica, hacer reaccionar un hapteno que tiene un grupo amina con un conector bifuncional de éster activo/maleimida para formar un hapteno activado; y hacer reaccionar la fracción de unión específica tiolada con el hapteno activado para formar el conjugado de hapteno-fracción de unión específica.

Se puede formar una fracción de unión específica tiolada haciendo reaccionar la fracción de unión específica con un agente reductor para formar la fracción de unión específica tiolada, por ejemplo, haciendo reaccionar la fracción de unión específica con un agente reductor para formar una fracción de unión específica tiolada que tiene un número medio de tioles por fracción de unión específica de entre 1 y 10. El número medio de tioles por fracción de unión específica se puede determinar mediante titulación. Algunos ejemplos de agentes reductores incluyen agentes reductores seleccionados del grupo compuesto por 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina, DTT, DTE y TCEP, y combinaciones de los mismos. En una realización concreta, el agente reductor se selecciona del grupo compuesto por DTT y DTE, y combinaciones de los mismos, y se utiliza a una concentración de entre 1 mM y 40 mM aproximadamente.

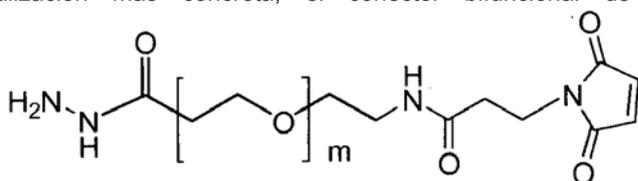
Alternativamente, la formación de la fracción de unión específica tiolada incluye la introducción de un grupo tiol en la fracción de unión específica. Por ejemplo, el grupo tiol se puede introducir en la fracción de unión específica mediante reacción con un reactivo seleccionado entre el grupo compuesto por 2-Iminotiolano, SATA, SATP, SPDP, N-Acetilhomocisteintiolactona, SAMSA, y cistamina, y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press, San Diego, 1996, que se incorpora al presente por referencia). En una realización más concreta, la introducción del grupo tiol en la fracción de unión específica consiste en hacer reaccionar la fracción de unión específica con un oxidante (como periodato) para convertir una fracción de azúcar (como en una porción glicosilada de un anticuerpo) de la fracción de unión específica en un grupo aldehído, para, a continuación, hacer reaccionar el grupo aldehído con cistamina. En otra realización más concreta, la fracción de unión específica incluye estreptavidina y la introducción del grupo tiol consiste en hacer reaccionar la estreptavidina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut).

En otras realizaciones concretas, la reacción del hapteno con un conector bifuncional de éster activo /maleimida para formar una nanopartícula activada incluye la reacción del hapteno con un éster activo/maleimida PEG que tiene la fórmula siguiente:



donde $n = 1$ a 50, por ejemplo, $n = 2$ a 30, como $n=3$ a 20 o $n = 4$ a 12.

5 En otro aspecto, se divulga un método para preparar la composición de un conjugado de hapteno-fracción de unión específica que incluye hacer reaccionar una fracción de unión específica con un oxidante para formar una fracción de unión específica portadora de aldehído; hacer reaccionar la fracción de unión específica portadora de aldehído con un conector bifuncional de hidrazida/maleimida para formar una fracción de unión específica reactiva de tiol; y hacer reaccionar la fracción de unión específica reactiva de tiol con un hapteno tiolado para formar el conjugado de nanopartícula-fracción de unión específica. En una realización concreta, la fracción de unión específica es un anticuerpo y la reacción de la fracción de unión específica con un oxidante para formar la fracción de unión específica portadora de aldehído incluye la oxidación (como con periodato, I_2 , Br_2 , o una combinación de los mismos, u oxidasa de galactosa/neuramidasa) de una región glicosilada del anticuerpo para formar el anticuerpo portador de aldehído. En una realización más concreta, la reacción de un anticuerpo con un oxidante para formar un anticuerpo portador de aldehído incluye la introducción de una media de entre 1 y 10 grupos aldehído por anticuerpo. En una realización más concreta, el conector bifuncional de hidrazida/maleimida tiene la fórmula siguiente:



donde $m = 1$ a 50, por ejemplo, $m = 2$ a 30, como $m=3$ a 20 o $m = 4$ a 12. Se puede formar un hapteno tiolado a partir de un hapteno, mediante la introducción de un grupo tiol en el hapteno (por ejemplo, haciendo reaccionar un hapteno con un reactivo seleccionado del grupo compuesto por 2-iminotiolano, SATA, SATP, SPDP, N-acetilhomocisteintiolactona, SAMSA y cistamina, y combinaciones de los mismos).

En otras realizaciones, un conjugado de conector-hapteno que tiene un grupo reactivo de hidrazida se hace reaccionar con un grupo carbonilo de un aldehído formado en un anticuerpo para formar el conjugado de anticuerpo-conector-hapteno. Los conjugados de hapteno-conector que tienen el grupo reactivo de hidrazida se tratan más adelante.

4. Conectores comercializados

También hay disponibles comercialmente otros conectores. Pierce Biotechnology Inc., of Rockford, Illinois, suministra determinados conectores que son útiles para la práctica de la presente invención. Por ejemplo, Pierce suministra sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC). Pierce vende también un compuesto de sulfonamidil sin este grupo sulfo, llamado SMCC, que también representa un conector útil. Sulfo-SMCC es un conector cruzado soluble en agua, de membrana no clivable e impermeable. Los ésteres de NH de este compuesto pueden reaccionar rápidamente con aminas primarias a un pH 7-9 para formar enlaces de amida estables. Las maleimidas reaccionan con grupos sulfhidrilo a un pH de entre 6 y 8, más típicamente de entre 6.5 y 7.5 aproximadamente, para formar enlaces de tioéter estables. Para su uso en el acoplamiento de los haptenos a un vehículo que comprende una amina libre, el sulfo-SMCC puede reaccionar con la amina libre del vehículo para proporcionar un vehículo activado por maleimida. El compuesto tipo vehículo se puede hacer reaccionar a continuación con un hapteno, como un hapteno que tiene un grupo hidroxilo o un grupo sulfhidrilo libre, para formar un conjugado de conformidad con la presente divulgación.

Pierce también suministra otros ejemplos de conectores, así como información adicional relativa a la longitud de cada uno de los conectores potencialmente adecuados para su uso en la práctica. Por ejemplo, para los grupos funcionales que reaccionan con aminas, Pierce suministra los compuestos siguientes: EGS (etilen glicol bis[succinimidilsuccinato]); Sulfo-EGS (etilen glicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato]); DTSSP (3,3'-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]); DSS (disuccinimidil suberato); BS (bis[sulfosuccinimidil] suberato); DSG (disuccinimidil glutarato); y MSA (metil N-succinimidil adipato). Algunos ejemplos de conectores reactivos de sulfhidrilo incluyen DPDPB (1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido]butano); BM[PEO]₃(1,11-bis-maleimidotrietilenglicol); BMH (bis-maleimidohexano); BM[PEO]₂(1,8-bis-maleimidodietilenglicol); HBVS (1,6-hexan-bis-vinilsulfona); DTME (ditio-bis-maleimidoetano); BMDB (1,4-bis-maleimidil-2,3-dihidroxiobutano); BMB (1,4-bis-maleimidobutano); y BMOE (bis-maleimidoetano). Pierce también suministra compuestos fotoreactivos, incluyendo BASED (bis-[b-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro) y APG (p-azidofenil glioxal monohidrato).

5. Acoplamiento con carbodiimidas

Se pueden utilizar carbodiimidas [R-N=C=N-R₁] para acoplar directamente haptenos a moléculas diana, incluyendo aminoácidos, proteínas, nucleótidos y oligonucleótidos. Véase, por ejemplo, New Biotinylating Reagent Utilizing Carbodiimide Function, Nucleic Acid Symposiums Series, N° 34, 69-70 (1995), que queda incorporado al presente por referencia. Alternativamente, las funcionalidades de la carbodiimida se pueden incorporar o acoplar a un conector, como se ha señalado anteriormente, para la formación de conjugados hapteno-conector. En los ejemplos siguientes se proporciona un sistema sintético general para la elaboración de hapteno-dPEGx-carbodiimidas. Utilizando este sistema sintético general se han elaborado varias realizaciones operativas de hapteno-carbodiimidas, incluyendo nitropirazol-dPEGx-carbodiimida, benzofurazano-dPEGx-carbodiimida, dinitrofenilo-dPEGx-carbodiimida, tiazolsulfonamida-dPEGx-carbodiimida y rotenoide-dPEGx-carbodiimida.

IV. Conjugados de hapteno-conector

Los compuestos de la presente divulgación, también denominados conjugados, comprenden típicamente un hapteno que normalmente se acopla a un conector. El conjugado de hapteno también puede incluir un vehículo, como un polipéptido, proteína, mononucleótido, dinucleótido, trinucleótido, oligonucleótido o ácido(s) nucleico(s), acoplado directamente al hapteno o al conector-vehículo. Entre los ejemplos concretos de vehículos se incluyen vehículos inmunogénicos, anticuerpos y sondas de ácido nucleico. El hapteno, vehículo y/o conector puede incluir uno o más grupos funcionales o fracciones, típicamente electrófilos y pares de electrófilo/nucleófilo, que son útiles para acoplar un hapteno a un vehículo, sea directa o indirectamente a través de un conector. De este modo, una primera fórmula general que describe determinadas realizaciones de la presente divulgación es hapteno-vehículo. Estos compuestos también incluyen opcionalmente, y típicamente, un conector. Las realizaciones que presentan un conector satisfacen la fórmula hapteno-conector-vehículo. Por tanto, una fórmula combinada es (hapteno)_k-(conector)_m-vehículo_n donde k es 1, m y n son 0 o 1, y al menos uno de los elementos m o n es 1. Un experto en la técnica entenderá que, para la fórmula general, k=1, m=1 o n=1 no implica ninguna limitación sobre el número o la estructura del hapteno, el conector o el vehículo. Por ejemplo, un vehículo puede tener múltiples conectores unidos y los múltiples conectores pueden estar unidos a múltiples haptenos para proporcionar un conjugado de la fórmula combinada. Por otra parte, un conector puede incluir una pluralidad de subunidades o estar formado por diversos subcomponentes. Por ejemplo, tanto un vehículo como un hapteno pueden incluir conectores unidos, donde los conectores pueden hacerse reaccionar para acoplar el hapteno y el vehículo juntos.

En una realización concreta, un conjugado de conformidad con la divulgación presenta la estructura general (fracción de unión específica)-conector-hapteno, y más concretamente (fracción de unión específica)-(conector-hapteno)_p, donde p=1-200, por ejemplo p=1-50, como 1-10. En un ejemplo, el conector comprende un conector PEG. En realizaciones más concretas, la fracción de unión específica es un anticuerpo o un ácido nucleico. En otro ejemplo, la fracción de unión específica es un anticuerpo y el conector incluye un grupo reactivo de carbonilo unido covalentemente a un grupo aldehído de una fracción de azúcar oxidada de una región Fc del anticuerpo. En otro ejemplo más, la fracción de unión específica es un anticuerpo y el conector incluye un grupo reactivo de sulhidrilo unido covalentemente a un grupo tiol del anticuerpo, donde el grupo tiol se genera reduciendo un enlace de disulfuro en el anticuerpo. En otro ejemplo más, la fracción de unión específica es un ácido nucleico y el conector incluye un grupo reactivo de carbonilo unido covalentemente a un residuo de citosina del ácido nucleico.

En otra realización concreta, un conjugado de conformidad con la divulgación tiene la estructura general hapteno-conector-RG, donde RG se refiere a un grupo reactivo, como un grupo reactivo de carbonilo, un grupo reactivo de tiol o un grupo reactivo de amina. A pesar de que típicamente un hapteno se unirá a un conector que porta un grupo reactivo, también se pueden obtener múltiples haptenos unidos a un conector que tiene un grupo reactivo, o bien múltiples conectores que presentan grupos reactivos unidos a un hapteno. Estos conjugados de hapteno-conector resultan particularmente útiles para unir un hapteno a un anticuerpo (como se ha señalado en el apartado anterior) y también para unir un hapteno a un vehículo inmunogénico, como KLH, a fin de proporcionar un inmunógeno que se pueda utilizar para estimular a un animal para que produzca un anticuerpo que se una específicamente al hapteno. Así pues, un anticuerpo que se une específicamente a un hapteno es un aspecto de la divulgación.

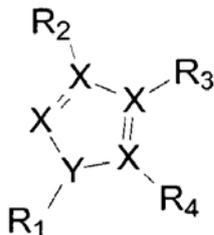
En otro aspecto más, se divulga un conjugado que incluye un anticuerpo anti-hapteno (de forma que se puede producir utilizando un inmunógeno divulgado) y una etiqueta detectable (como un quantum dot o enzima). De este modo, una fórmula general para este tipo de conjugado es (anticuerpo anti-hapteno)_t - (etiqueta detectable)_s donde t y s pueden ser, cada una de ellas independientemente 1-100, aunque más típicamente, t = 1 y s = 1-10. Los conjugados de anticuerpos anti-hapteno con etiquetas detectables se pueden utilizar conjuntamente con otros conjugados de hapteno-vehículo (tales como sondas de ácido nucleico etiquetadas con hapteno para secuencias genómicas diana y anticuerpos primarios etiquetados con hapteno que se unen específicamente a proteínas diana) para permitir ensayos multiplexados de múltiples dianas en una única muestra.

Los conjugados de la presente divulgación se pueden formar acoplando uno de los ejemplos de conector o conectores divulgados a un hapteno o haptenos divulgados. Muchos de los haptenos disponen de múltiples lugares a los que se puede acoplar un conector. Las posiciones del conector adecuadas con respecto a las fórmulas generales proporcionadas para los haptenos divulgados se indican a continuación, al tratarse de las fórmulas generales para conjugados de hapteno-conector. Determinados conjugados de hapteno-conector se proporcionan

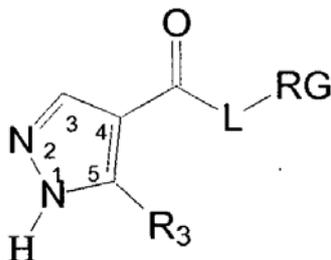
por referencia a los conectores PEG, al tratarse de los protocolos para sintetizar estos compuestos.

1. Oxazoles y pirazoles

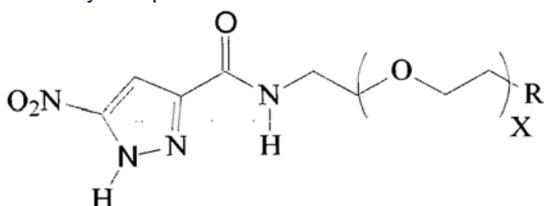
- 5 Una primera clase general de haptenos de la presente divulgación son los oxazoles y pirazoles, más típicamente nitro oxazoles y nitro pirazoles, que tienen la fórmula química general siguiente, como se debate más detalladamente en el presente.



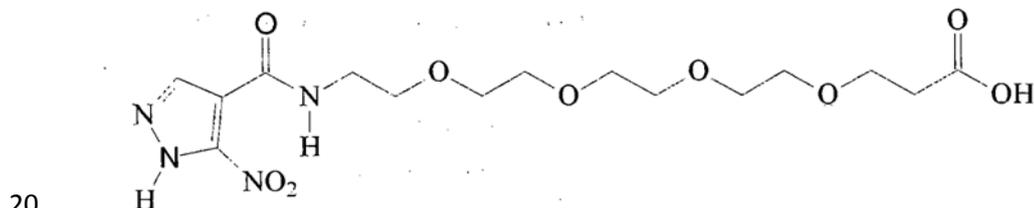
- 10 Cualquiera de las posiciones R₁-R₄, o más de una de ellas, se puede acoplar a un conector. La posición ocupada por el sustituyente de R₂ es bastante adecuada para acoplar conectores a esta clase de haptenos, como se indica a continuación, donde L es un conector y RG es un grupo funcional reactivo.



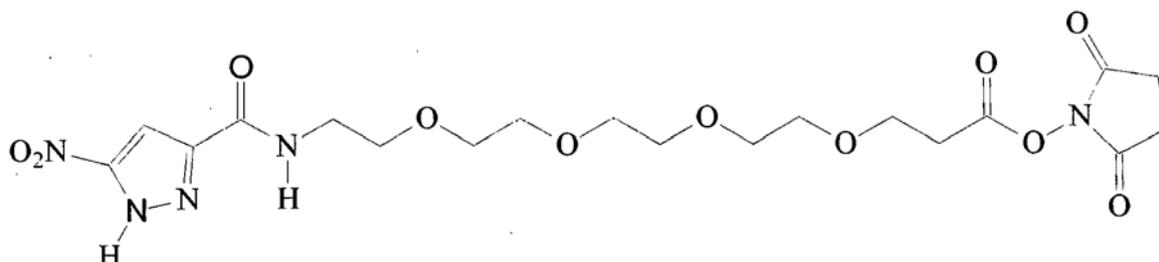
- 15 Los conjugados de hapteno-conector se han formado utilizando conectores basados en PEG. Un ejemplo de este tipo de compuesto, 5-nitro-3-pirazol carbamida, se muestra a continuación. Para esta realización y las posteriores, X es entre 2 y 24 aproximadamente.



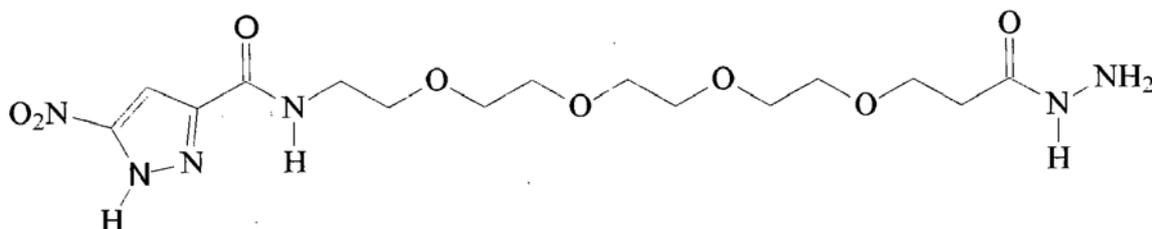
A continuación se proporciona una realización concreta en la que X es 4.



Este ejemplo satisface la fórmula hapteno-L-RG, donde L es un PEG 4 (4 unidades de óxido de etileno) y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. En realizaciones operativas, el grupo funcional de ácido carboxílico se ha convertido en otros grupos funcionales reactivos. Por ejemplo, el grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en un éster activado, como un éster NHS, tal y como se muestra a continuación.

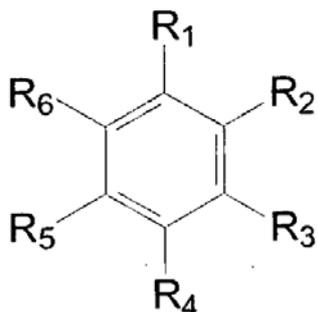


Y, el éster activado se puede convertir en otro grupo funcional reactivo útil, como hidrazida, tal y como se ilustra a continuación.

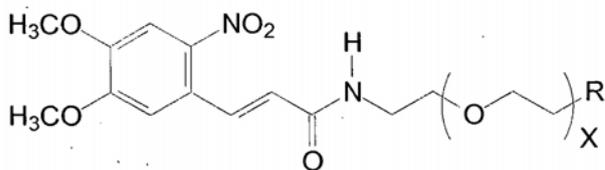


5 2. Nitroarilo

Una segunda clase general de hapteno de la presente divulgación son compuestos de nitroarilo que tienen la fórmula química general siguiente.

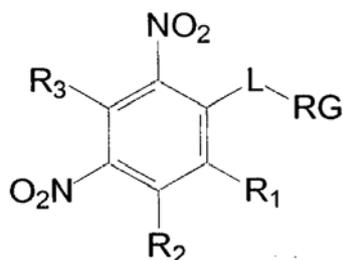


10 Estos compuestos tienen al menos un grupo nitro (y opcionalmente varios), de forma que al menos uno de R₁-R₆ es nitro. Cualquiera de las posiciones R₁-R₆ no acopladas a un grupo nitro es una posición potencial para el acoplamiento de conectores al anillo de arilo. Los compuestos de mononitrofenilo se representan mediante conjugados de nitroccinamida-hapteno, tal y como se ilustra a continuación.



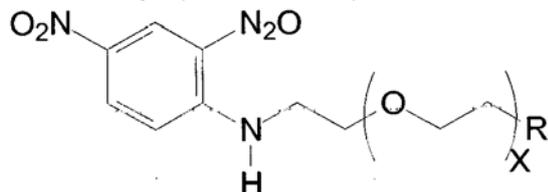
15

Las realizaciones operativas también se ejemplifican a través de los compuestos de 2,4-dinitrofenilo. A continuación se ilustran ejemplos de conjugados de haptenos de esta clase, donde R₁-R₃ son los anteriormente señalados.

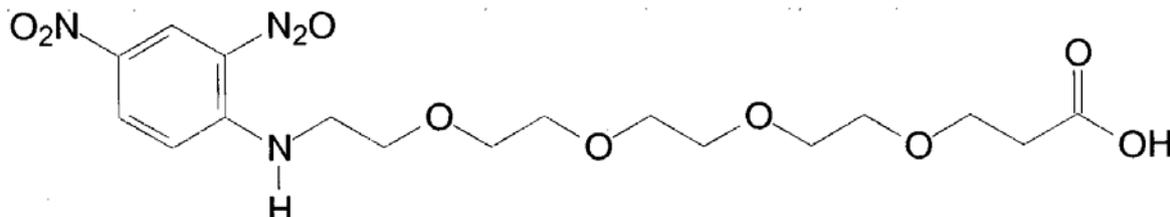


20 Los conjugados de hapteno-conector se han formado utilizando conectores basados en PEG. A continuación se

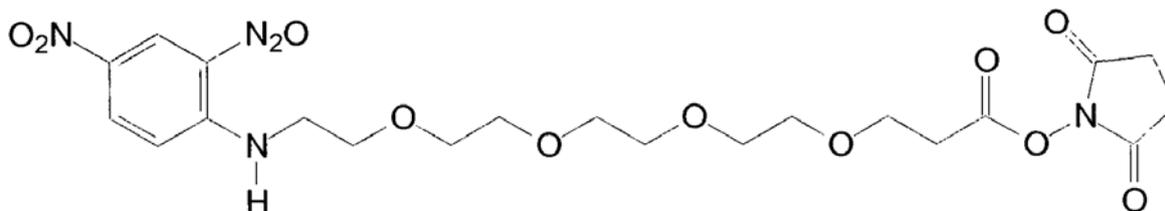
muestra un ejemplo de este compuesto.



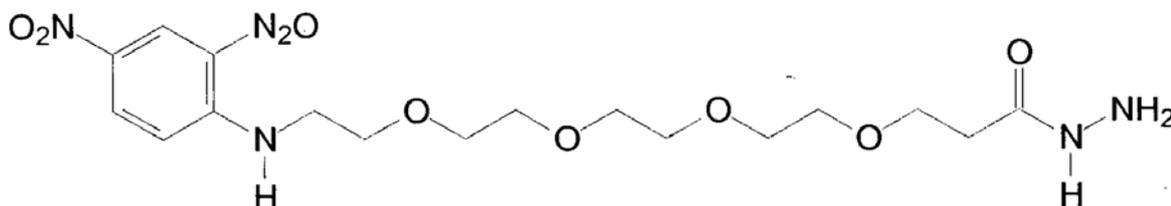
Una realización concreta tenía la estructura siguiente.



- 5 Por tanto, este ejemplo satisface la fórmula hapteno-L-RG, donde L es PEG 4 (4 unidades de óxido de etileno) y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. En realizaciones operativas, el grupo funcional de ácido carboxílico se ha convertido en otros grupos funcionales reactivos. Por ejemplo, el grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en un éster activado, como un éster NHS, tal y como se muestra a continuación.

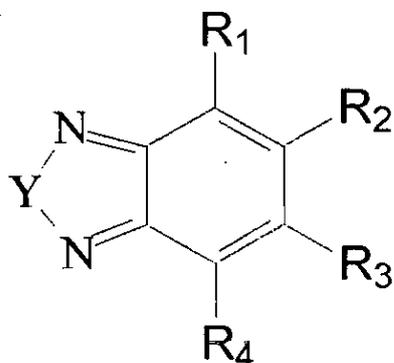


- 10 El éster activado se puede convertir en otro grupo funcional reactivo útil, como hidrazida, tal y como se ilustra a continuación.



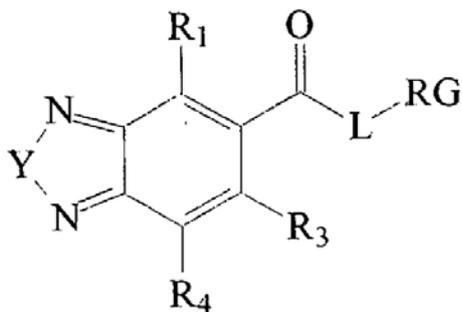
15 3. Benzofurazano y compuestos relacionados

[0208] Los benzofurazanos y derivados de los mismos son otra clase de haptenos de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general para los compuestos de tipo benzofurazano.

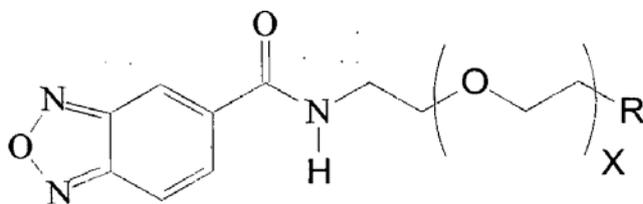


- 20 Los sustituyentes R_1 - R_4 e Y son los anteriormente indicados. Al menos uno de los sustituyentes R_1 - R_4 está unido a un conector, un vehículo o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o un vehículo. Las posiciones R_2 y R_3 se utilizan muy probablemente para acoplar el conector a esta clase de haptenos (R_2 y R_3 pueden ser sustancialmente idénticos en términos de reactividad, particularmente si R_1 y R_4 son iguales). Estos conjugados

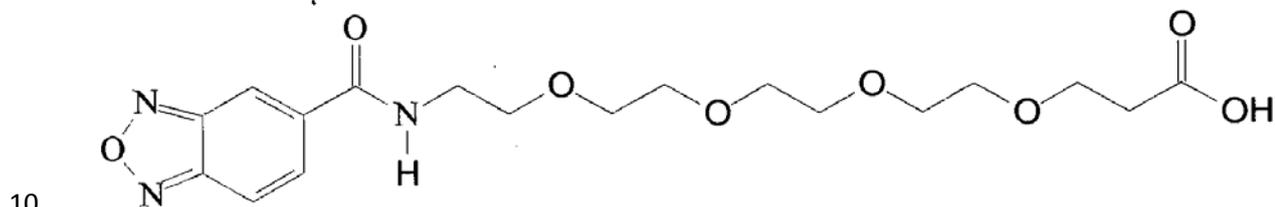
de hapteno se ejemplifican por la fórmula general que se proporciona a continuación.



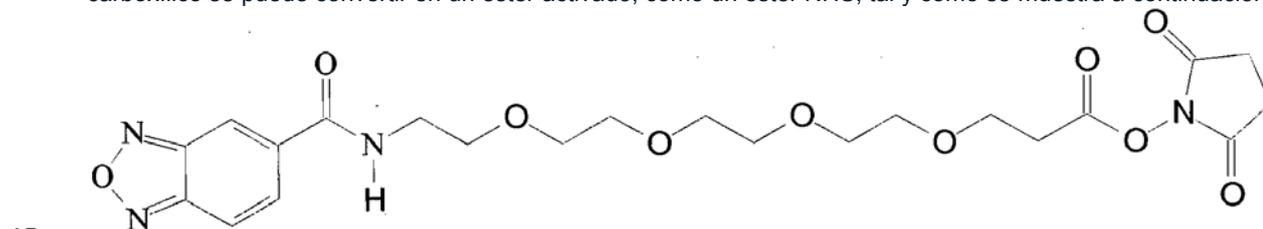
5 Los conjugados de hapteno-conector se han formado utilizando conectores basados en PEG. A continuación se muestra un ejemplo de este compuesto, 2,1,3-benzoxadiazol-5-carbámid.



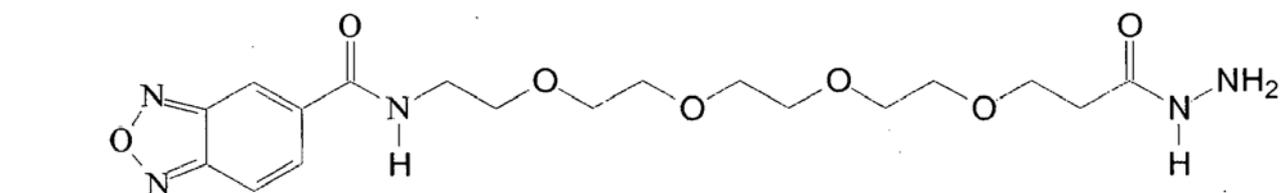
Una realización concreta tenía la fórmula siguiente:



Este ejemplo satisface la fórmula hapteno-L-RG, donde L es un PEG 4 (4 unidades de óxido de etileno) y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. En realizaciones operativas, el grupo funcional de ácido carboxílico se ha convertido en otros grupos funcionales reactivos. Por ejemplo, el grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en un éster activado, como un éster NHS, tal y como se muestra a continuación.



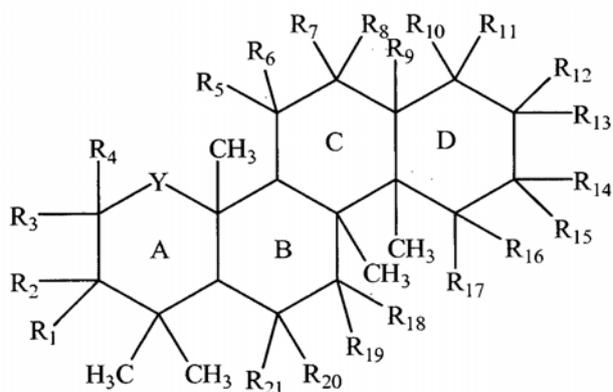
El éster activado se puede convertir en otro grupo funcional reactivo útil, como hidrazida, tal y como se ilustra a continuación.



4. Triterpenos

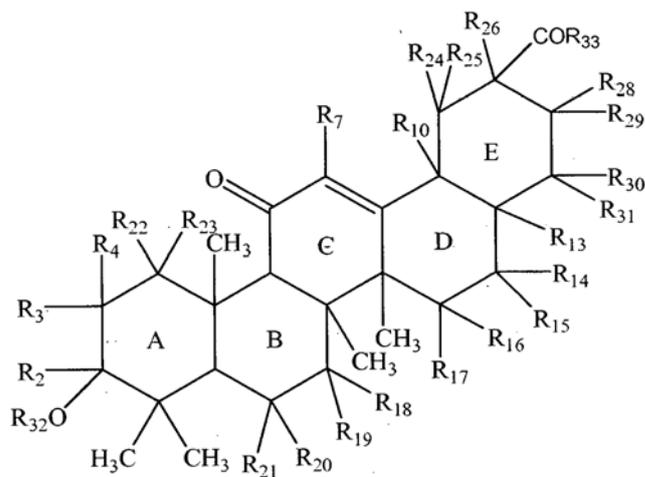
Los triterpenos son otra clase de haptenos incluidos en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. La estructura de anillo básica común a los triterpenos son cuatro anillos fusionados de seis miembros, A-D, tal como se indica a continuación, donde los sustituyentes R₁-R₂₁ e Y son los anteriormente indicados.

5



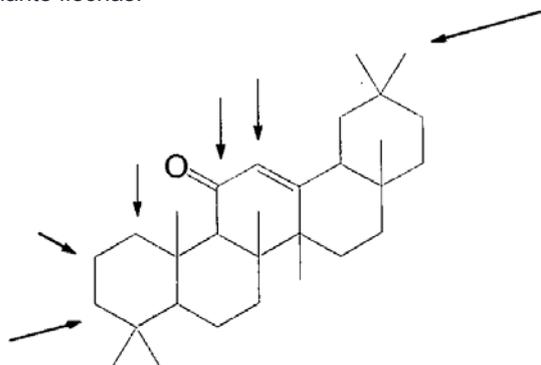
Las realizaciones divulgadas de los triterpenos que ejemplifican esta clase de haptenos también pueden incluir un anillo E, que puede tener diferentes tamaños de anillo. Por ejemplo, el anillo E podría ser un anillo de 5 o 6 miembros. A menudo, estos compuestos incluyen una cetona alfa-beta insaturada, tal como se ilustra a continuación para el anillo C.

10

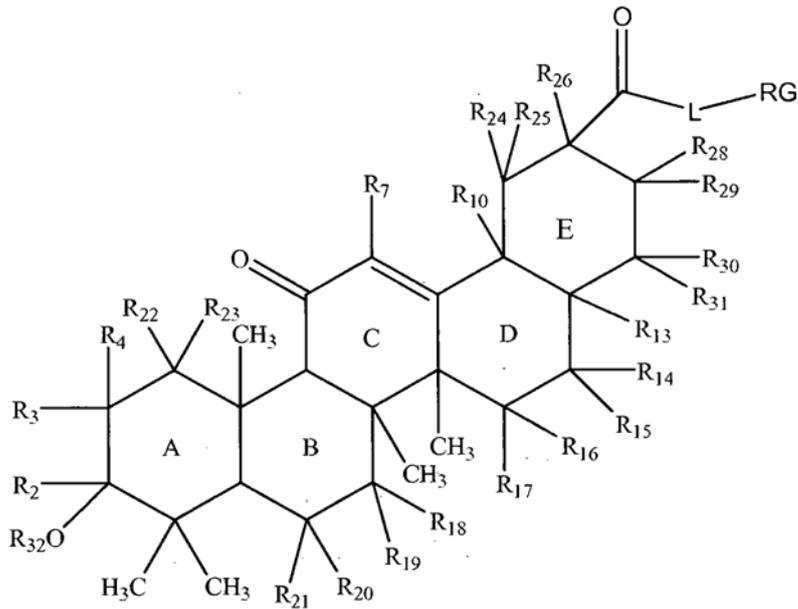


Un experto en la técnica apreciará que muchas de las posiciones ocupadas por los grupos R en estas fórmulas generales pueden resultar útiles para el acoplamiento de los haptenos con un conector para formar un conjugado reactivo. Con respecto a los compuestos alfa-beta insaturados, a continuación se indican posiciones para el conector mediante flechas.

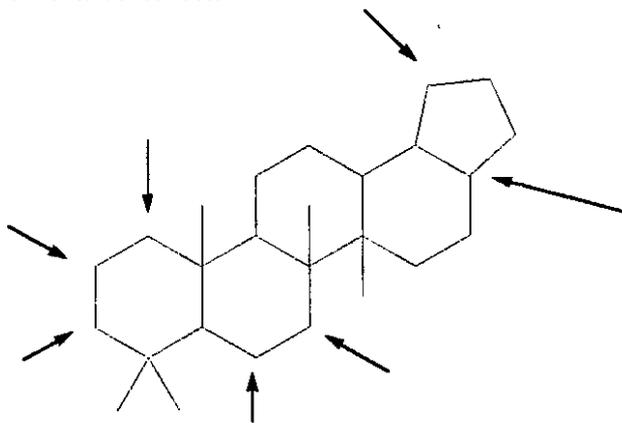
15



Por ejemplo, los conjugados de hapteno de la presente invención. Un conjugado reactivo concreto de acuerdo con esta clase de haptenos tiene la fórmula siguiente:

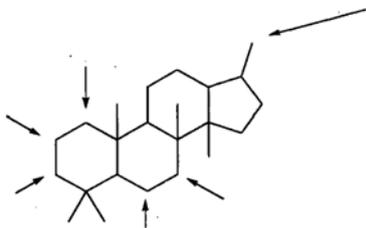


A continuación se proporcionan otros ejemplos de estructuras de triterpeno y potenciales posiciones de acoplamiento del conector.



5

Estructuras del núcleo de ácido equinocístico, ursólico y betulínico



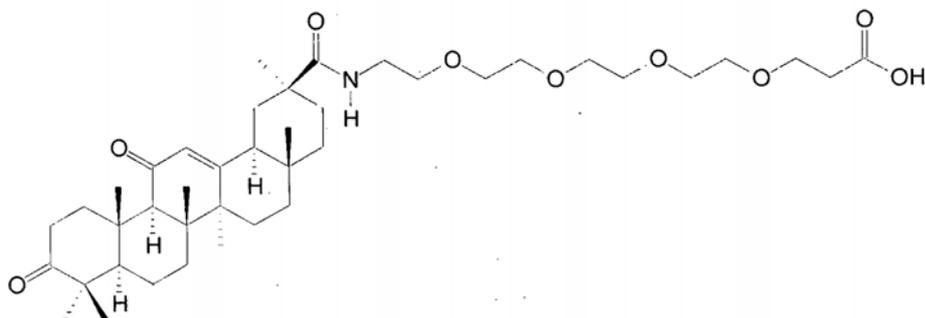
10

Cadena de alquilo (derivado de prenilo), anillo de gamma-lactona o furano

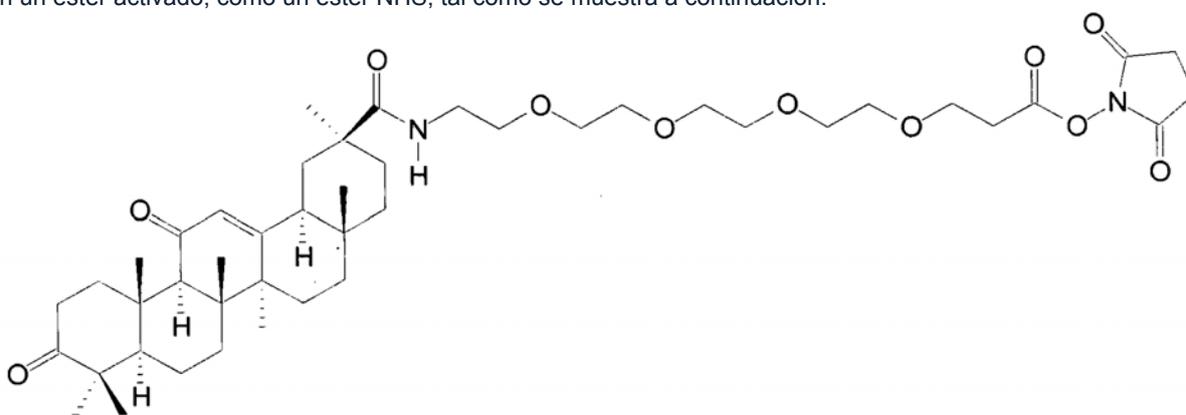
Núcleo de cucurbitacina

Los conjugados de hapteno-conector se han formado utilizando conectores basados en PEG. A continuación se muestra un ejemplo

de este tipo de compuesto.



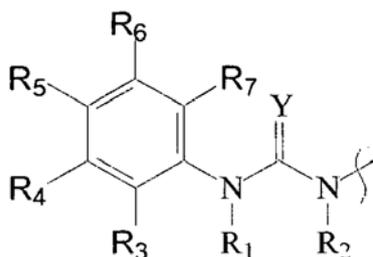
5 Por tanto, este ejemplo satisface la fórmula hapteno-L-RG, donde L es PEG 4 (4 unidades de óxido de etileno) y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. El grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en un éster activado, como un éster NHS, tal como se muestra a continuación.



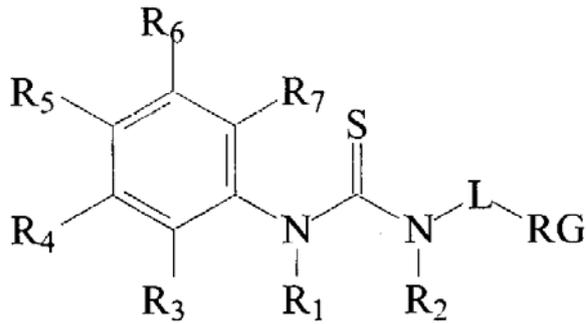
10 El éster activado ilustrado se ha acoplado directamente a un vehículo de proteína. Alternativamente, el éster activado se podría convertir en un grupo funcional reactivo diferente, como hidrazida, mediante tratamiento protegido, por ejemplo un reactivo de hidrazina protegido por BOC, si se desea.

5. Ureas y tioureas

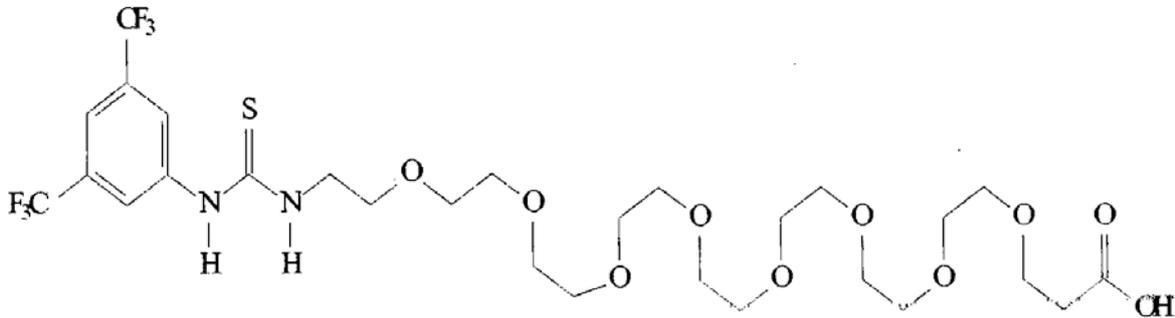
Las ureas/tioureas, concretamente las ureas y tioureas de arilo y heteroarilo, son otra clase de haptenos incluidos en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. Típicamente los derivados de arilo tienen la fórmula siguiente:



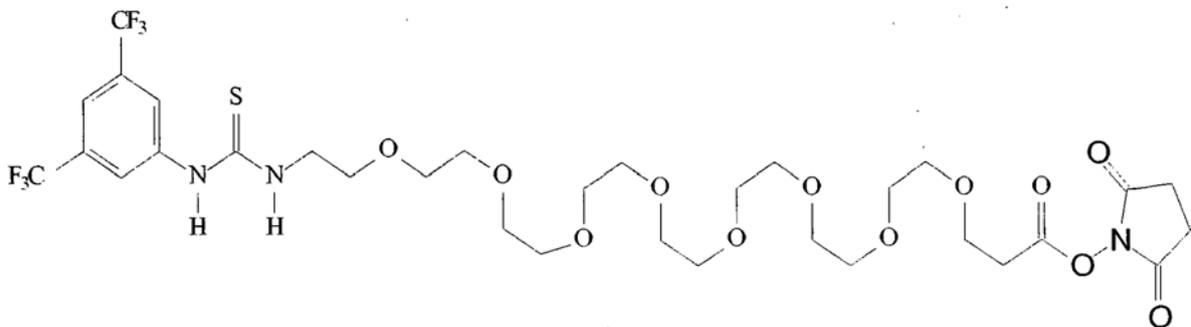
15 Al menos uno de los sustituyentes R₃-R₇ también puede estar unido a un conector, a un vehículo, o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector y/o a una molécula vehículo. Alternativamente, el grupo funcional de urea/tiourea puede utilizarse para acoplar un conector a esta clase de haptenos divulgados. A continuación se proporciona un ejemplo de conjugado de hapteno, con referencia en particular a las tioureas.



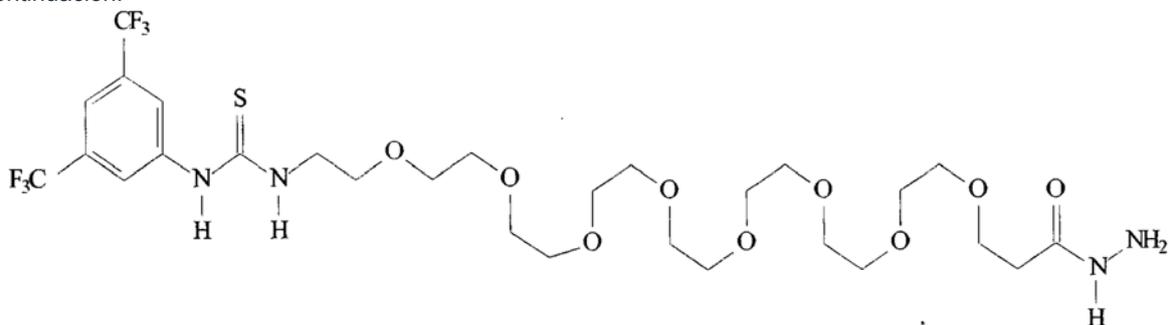
Los conjugados de hapteno-conector se han formado utilizando conectores basados en PEG. A continuación se muestra un ejemplo de este compuesto.



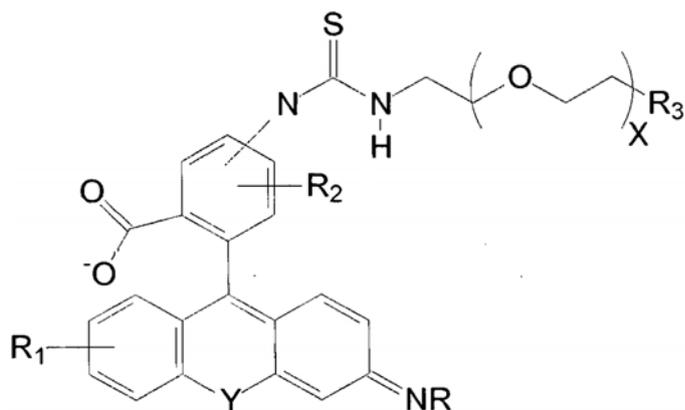
- 5 Por tanto, este ejemplo satisface la fórmula hapteno-L-RG, donde L es PEG 8 (8 unidades de óxido de etileno) y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. El grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en un éster activado, como un éster NHS, tal como se muestra a continuación.



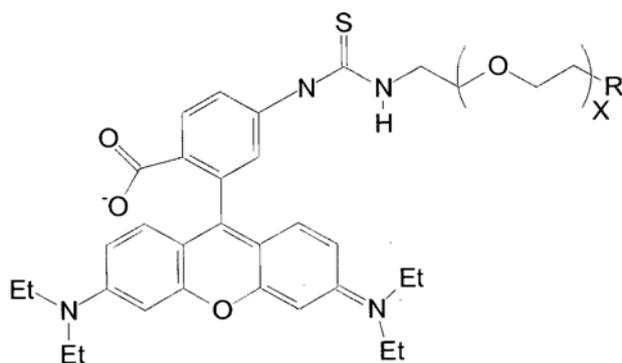
- 10 El éster activado se puede convertir en otro grupo funcional reactivo útil, como hidrazida, tal como se ilustra a continuación.



- 15 De conformidad con la presente divulgación, los conjugados de hapteno de tiourea de rodamina tienen la fórmula siguiente:

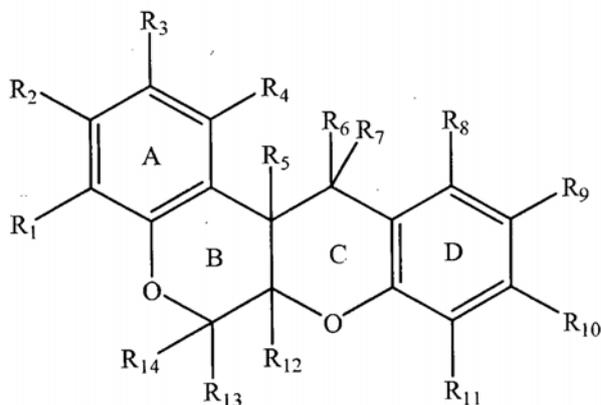


Con respecto a esta fórmula, R se selecciona típica e independientemente entre hidrógeno, alifático, particularmente alquilo, heteroalifático, alifático sustituido, como haluro de alquilo, arilo, heteroarilo y combinaciones de los mismos. R₁ se selecciona típica e independientemente entre hidrógeno, alifático, particularmente alquilo, heteroalifático, alifático sustituido, como haluro de alquilo, alcohol, amina, amina sustituida, como amina de alquilo inferior, como amina de dietilo, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo y combinaciones de los mismos. R₂ se selecciona típica e independientemente entre hidrógeno, alifático, particularmente alquilo, heteroalifático, alifático sustituido, como haluro de alquilo, alcohol, amina, amina sustituida, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo y combinaciones de los mismos. Y es oxígeno, nitrógeno o azufre. Una realización concreta de una tiourea de rodamina B tenía la fórmula siguiente:

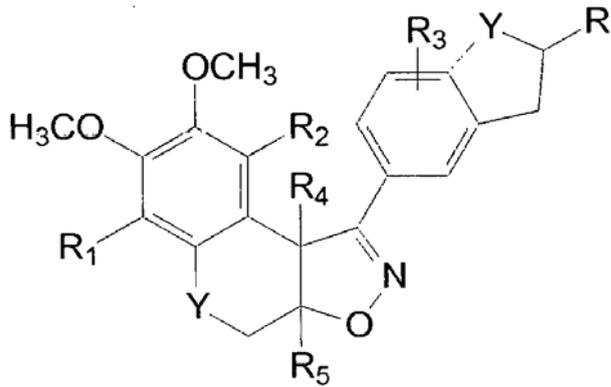


6. Rotenona y haptenos basados en rotenona

La rotenona y los haptenos basados en rotenona definen otra clase de haptenos incluidos en el ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporcionan fórmulas generales para la rotenona y los haptenos basados en rotenona.



Fórmula 1

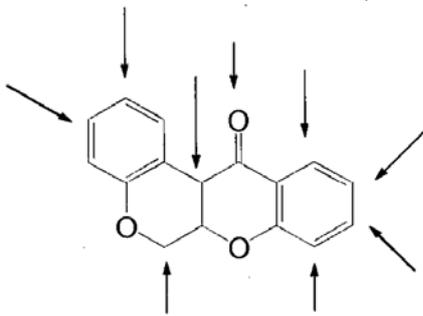


Fórmula 2

Cualquiera de las posiciones de R₁-R₁₄ se puede utilizar para acoplar conectores a esta clase de haptenos.

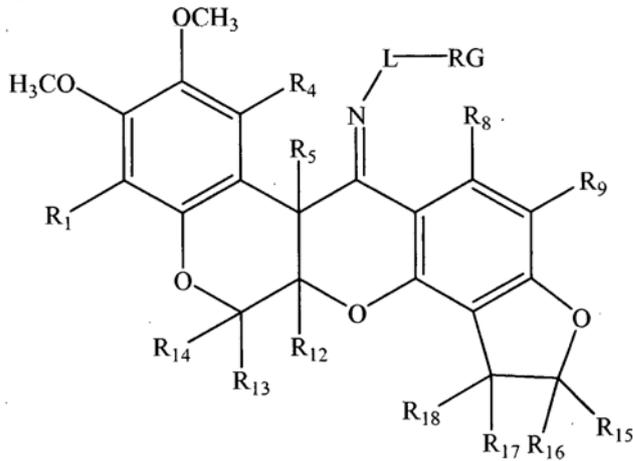
Determinados compuestos concretos de la Fórmula 1 tienen R₆ y R₇ y forman un doble enlace, como un doble enlace con oxígeno para formar un carbonilo o un doble enlace con nitrógeno para formar una amina. A continuación se proporcionan algunos ejemplos concretos de posiciones de acoplamiento del conector con respecto a estos conjugados de hapteno.

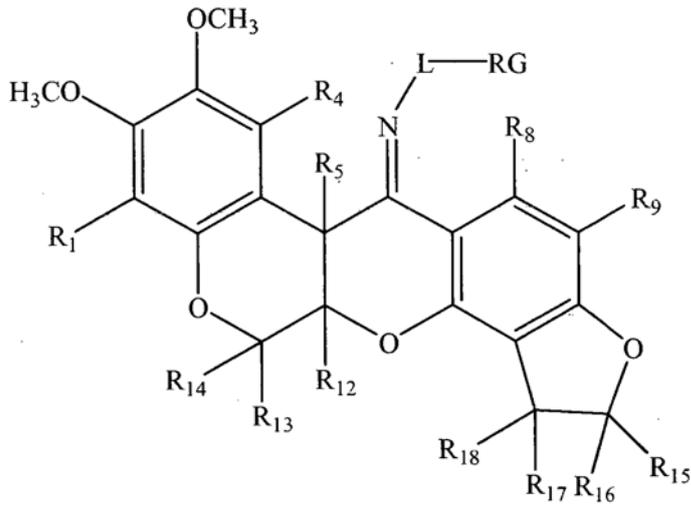
5



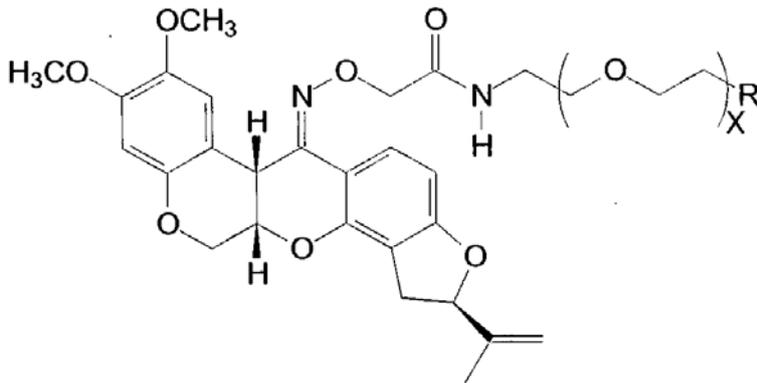
Un experto en la técnica apreciará que el compuesto de carbonilo se puede utilizar para la unión al conector. Esta clase de conjugados de hapteno se ejemplifica mediante las fórmulas generales que se proporcionan a continuación.

10

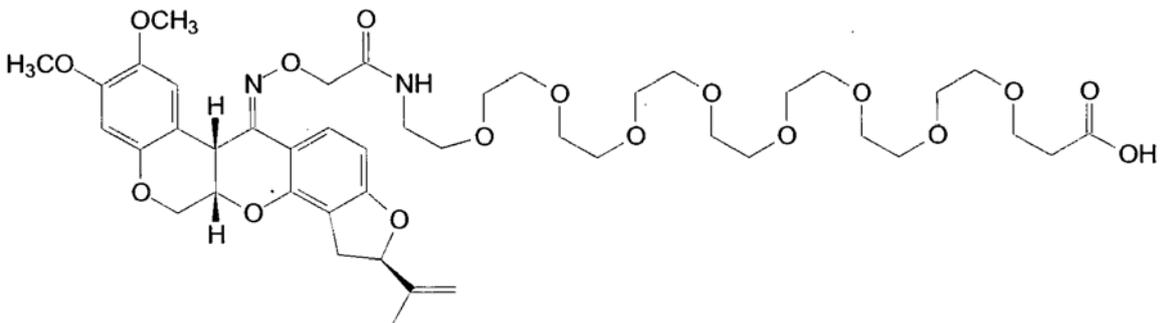




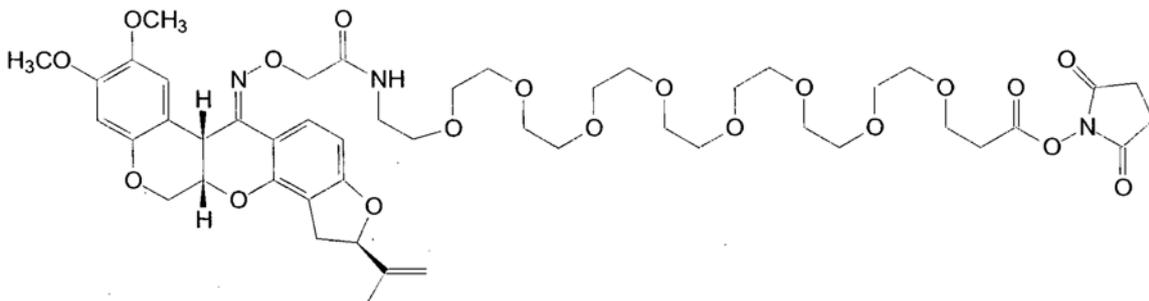
A continuación se muestra un ejemplo de un conjugado de hapteno-conector que tiene un conector basado en PEG.



Una realización concreta tenía la fórmula siguiente.

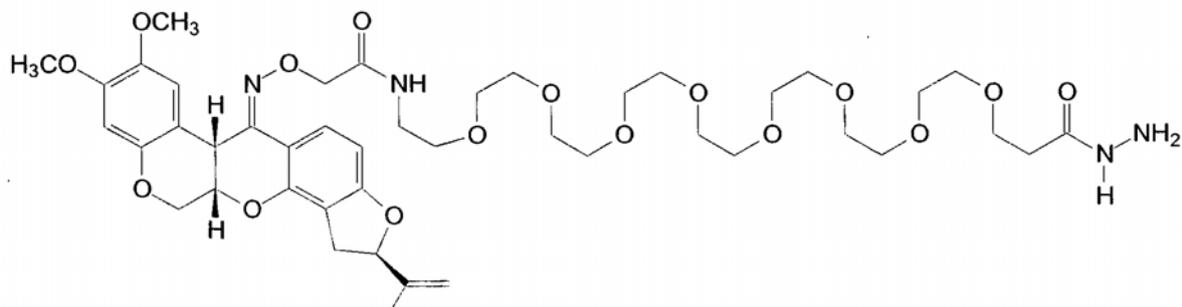


5 Este ejemplo satisface la fórmula hapteno-L-RG, donde L es PEG 8 (8 unidades de óxido de etileno) y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. El grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en el grupo funcional reactivo diferente que se desee, como un éster activado, incluyendo el éster NHS que se muestra a continuación.



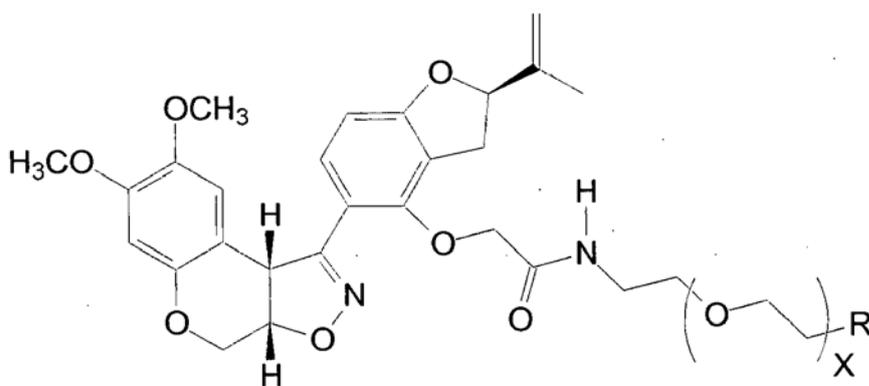
10 El éster activado se puede convertir en otro grupo funcional reactivo útil, como hidrazida, tal como se ilustra a

continuación.



En

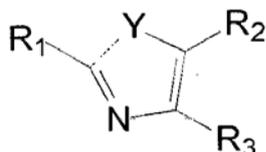
el caso de las isoxazolininas de rotenona, algunos ejemplos de conjugados de hapteno-conector tenían la fórmula siguiente.



5

7. Oxazol y tiazol sulfonamidas

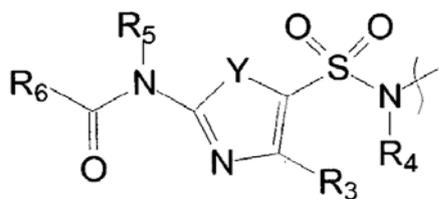
Las oxazol y tiazol sulfonamidas proporcionan otra clase de haptenos dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general para las oxazol y tiazol sulfonamidas.



10

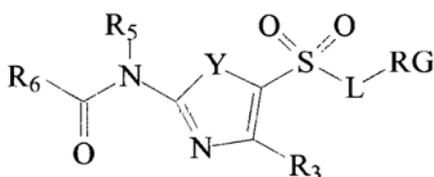
Una o más de las posiciones de R₁-R₃ se pueden utilizar para acoplar un conector o vehículo a esta clase de haptenos para formar conjugados de hapteno. En determinados ejemplos de realizaciones operativas, R₁ ha sido amido, como los derivados de amida que se muestran a continuación. En el caso de estos compuestos, las posiciones de R₂ y R₃ son adecuadas para el acoplamiento a un conector. En determinadas realizaciones operativas, R₂ ha sido -SO₂, y se ha utilizado para acoplar conectores mediante la formación de una sulfonamida. Por tanto, a continuación se indica una segunda fórmula general para realizaciones operativas de haptenos que ejemplifican esta clase de haptenos.

15

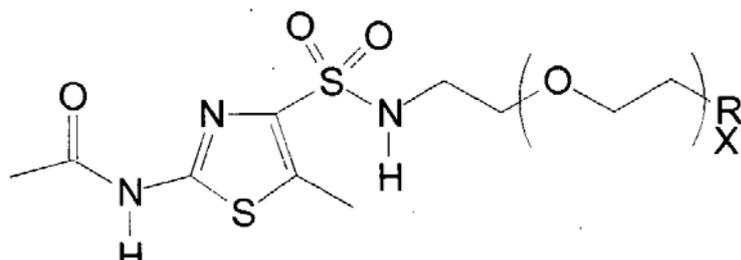


20

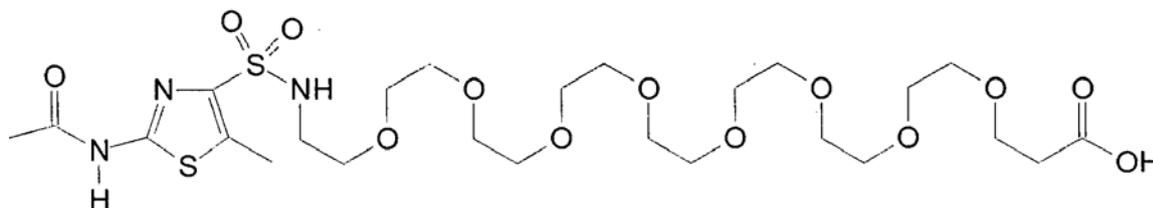
Los ejemplos de conjugados de hapteno basados en esta fórmula general incluyen aquellos que tienen la fórmula siguiente:



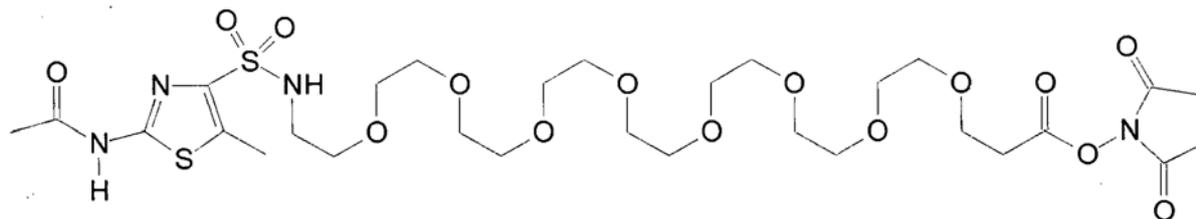
Los conjugados de hapteno-conector se han formado utilizando conectores basados en PEG. Un ejemplo de este compuesto, 2-acetamido-4-metil-5-tiazolsulfonamida, se muestra a continuación.



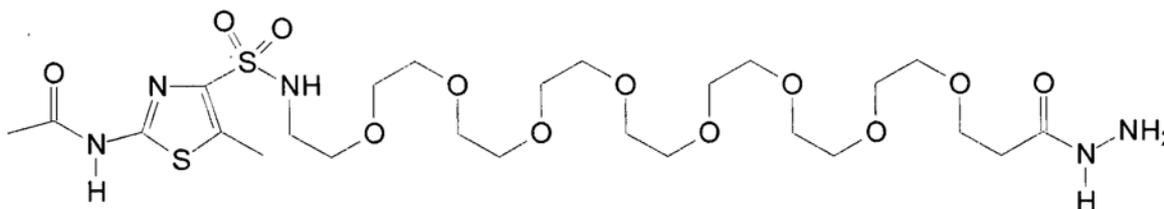
Una realización concreta tenía la estructura siguiente.



5 Este ejemplo satisface la fórmula hapteno-L-RG, donde L es PEG 8 (8 unidades de óxido de etileno) y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. El grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en el grupo funcional reactivo diferente que se desee, como un éster activado, incluyendo el éster NHS que se muestra a continuación.



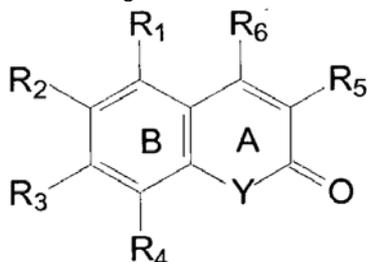
10 El éster activado se puede convertir en otro grupo funcional reactivo útil, como hidrazida, tal como se ilustra a continuación.



8.

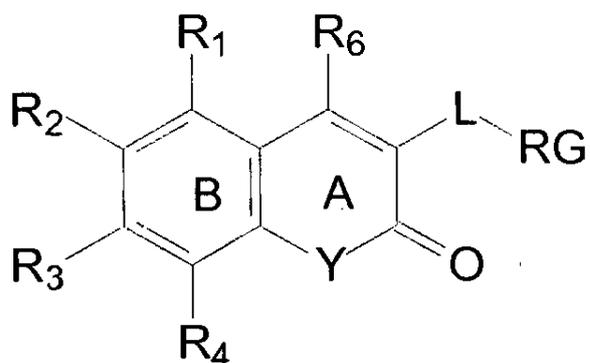
Cumarinas

15 La cumarina y derivados de cumarina proporcionan otra clase de haptenos dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general para la cumarina y derivados de cumarina.

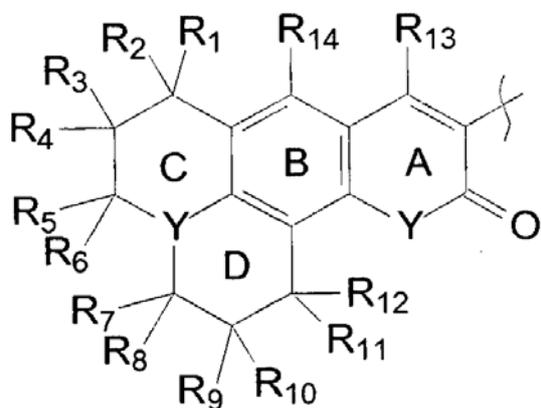


20 Cualquiera de las posiciones de R₁-R₆ también está típicamente unida a un conector, a un vehículo o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o a una molécula vehículo. Determinadas realizaciones operativas han utilizado la posición indicada como si contuviese un sustituyente R₅ para el acoplamiento a conectores. La posición ocupada por el sustituyente de R₆ puede ser importante si se utiliza la fluorescencia para detectar estos compuestos. Se considera que los sustituyentes distintos de hidrógeno en la posición ocupada por R₆

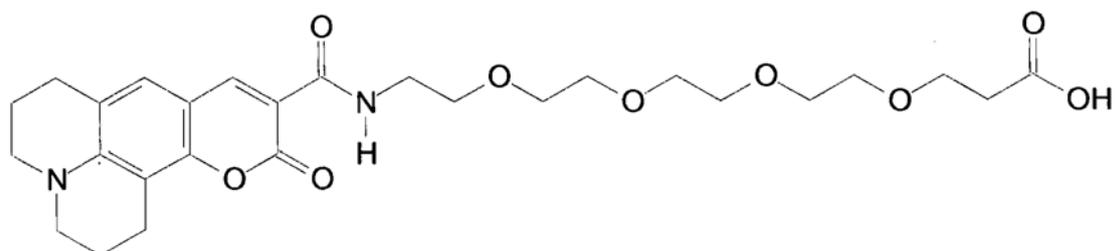
en la fórmula general inhiben la fluorescencia, aunque estos derivados pueden seguir siendo cromóforos. Algunos ejemplos de conjugados de hapteno realizados utilizando esta fórmula tienen la siguiente fórmula general:



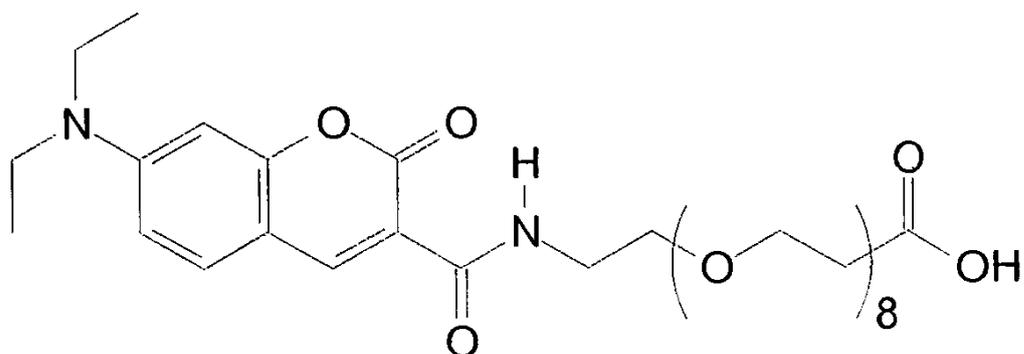
- 5 Las realizaciones operativas típicamente se fusionaron con los sistemas de anillo A-D, tal como se indica a continuación.



A continuación se proporcionan conjugados de hapteno que ejemplifican esta clase.

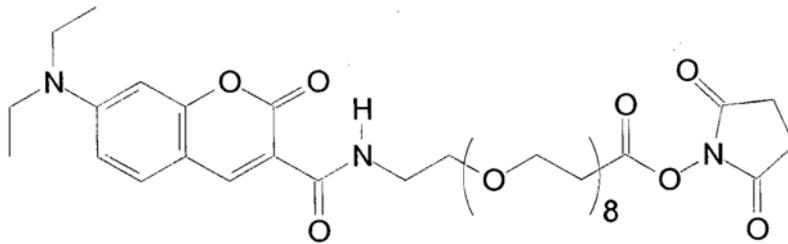
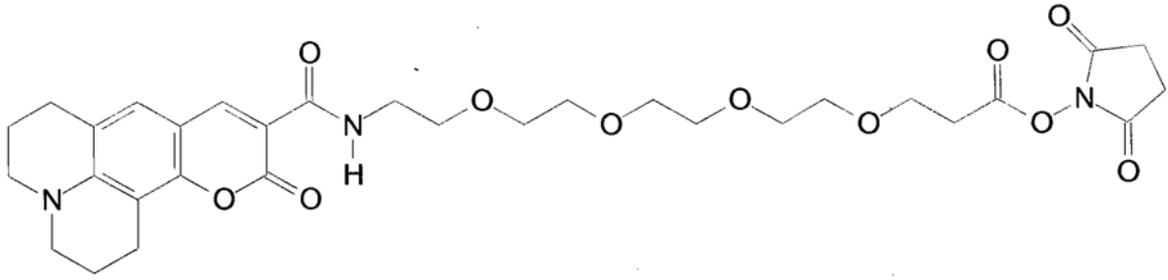


10



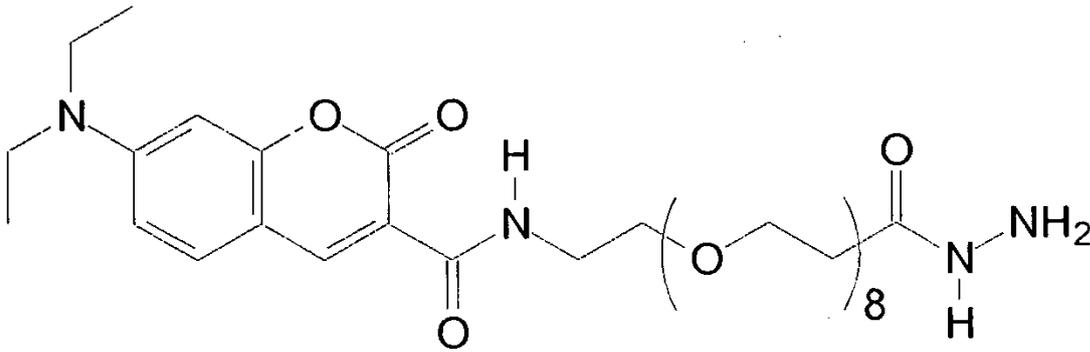
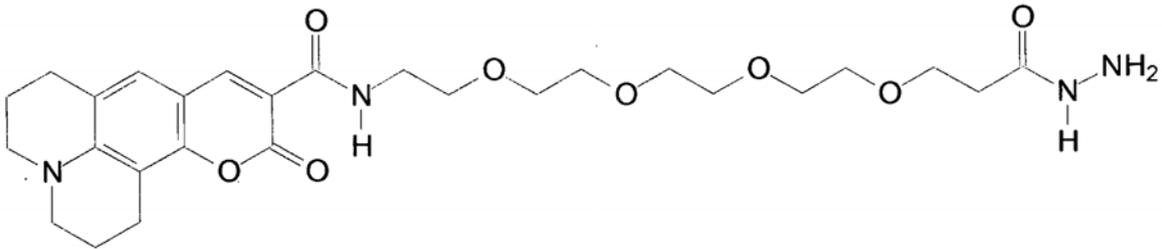
Estos ejemplos satisfacen la fórmula hapteno-L-RG, donde L es un conector PEG y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. El grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en el grupo funcional reactivo diferente que se desee, como un éster activado, incluyendo los ésteres NHS que se muestran a

continuación.



Los ésteres NHS se pueden convertir en otro grupo funcional reactivo útil, como hidrazida, tal como se muestra a continuación.

5

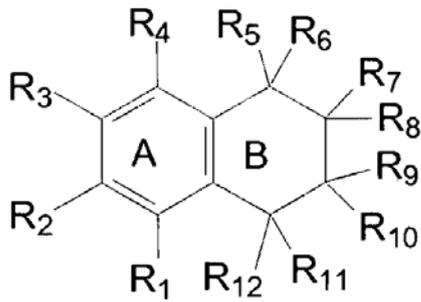


9.

Ciclolignanos

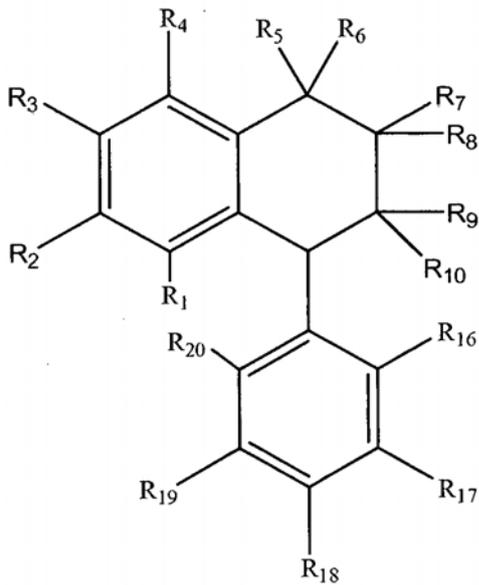
Los ciclolignanos proporcionan otra clase de haptenos dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación. A continuación se proporciona una primera fórmula general, comentada de forma más detallada a continuación.

10



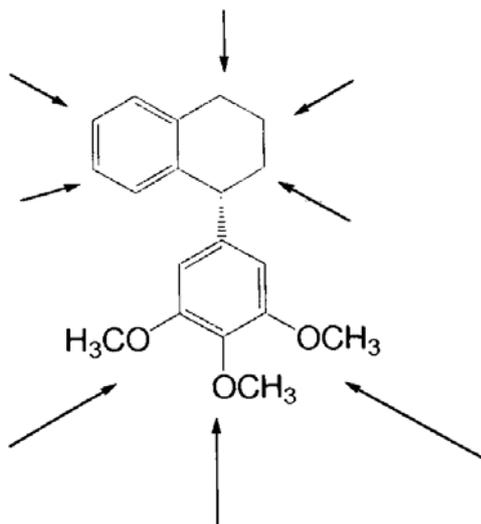
Al menos uno de los sustituyentes de R₁-R₁₂ está típicamente unido a un conector o un vehículo, o es un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con un conector o un vehículo. Al menos uno de R₁₂ y R₁₁ también es a menudo un grupo arilo, como un anillo de benceno o un anillo de benceno sustituido. Algunos ejemplos de compuestos donde al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es un grupo arilo tienen típicamente la fórmula general siguiente, donde los sustituyentes R son los anteriormente indicados.

5

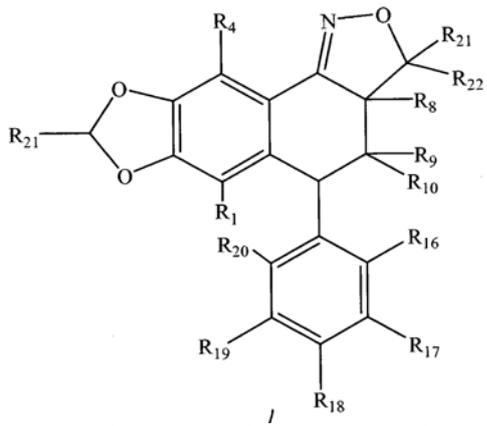


R₉ suele ser -L-RG, y R₁₆-R₂₀ son independientemente hidrógeno y alcoxi, típicamente alcoxi inferior, como metoxi, tal y como se muestra a continuación. La siguiente fórmula molecular general indica posiciones probables para acoplar los conectores a esta clase de haptenos.

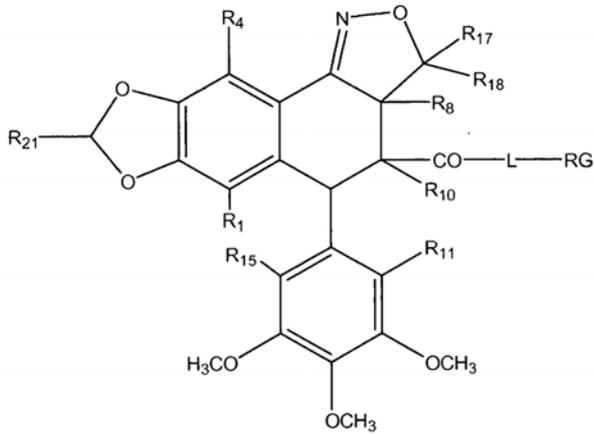
10



Otra fórmula general útil para describir especies de compuestos dentro de esta clase es la siguiente:

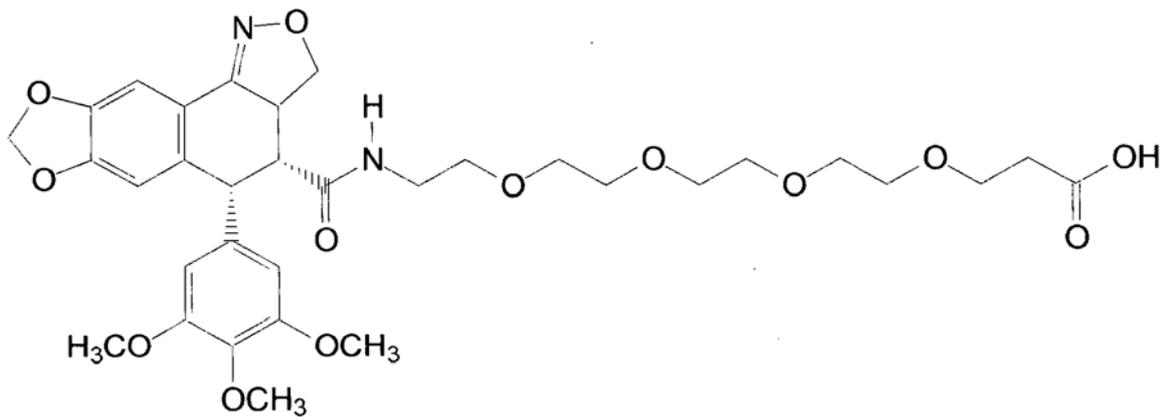


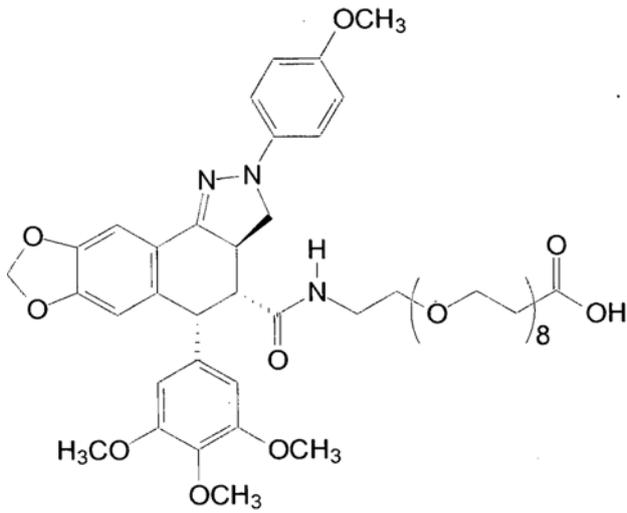
Como sucede con todos los conjugados de hapteno de la presente divulgación, al menos uno de los sustituyentes R está típicamente unido a un conector, es un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con un conector, o es -L-RG. Por ejemplo, R9 suele ser -L-RG, tal como se indica a continuación.



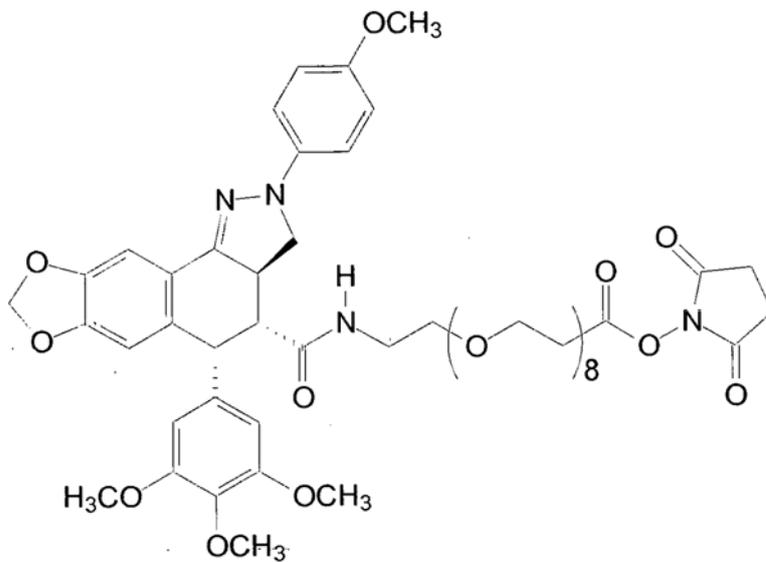
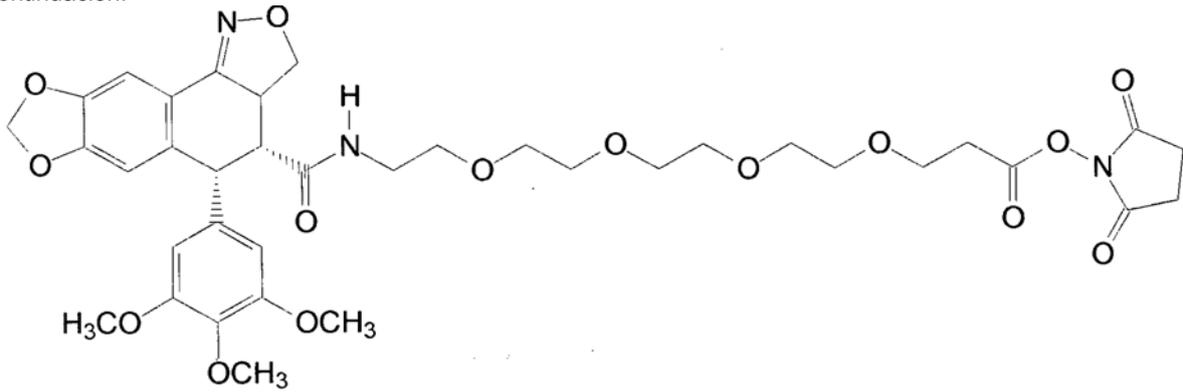
5

A continuación se proporcionan ejemplos de conjugados de hapteno-L-RG que ejemplifican esta clase.

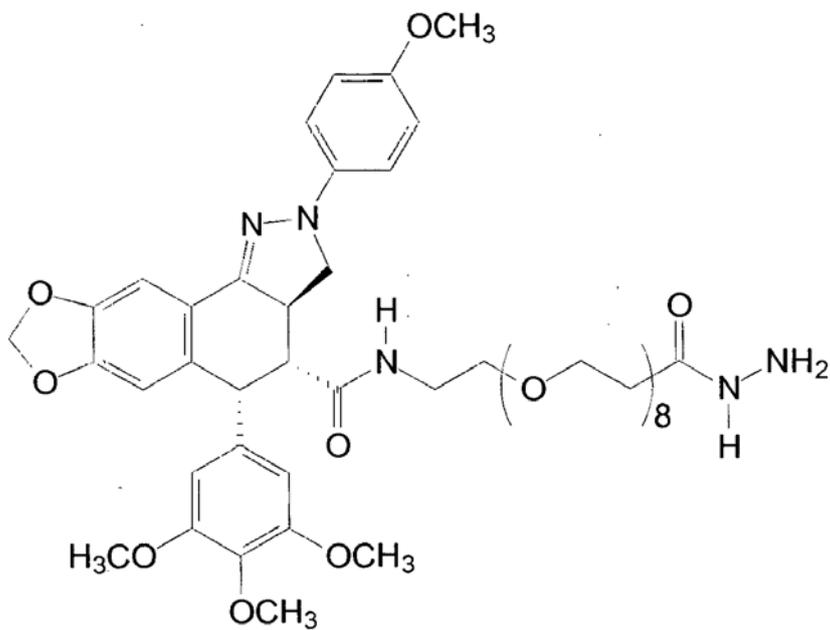
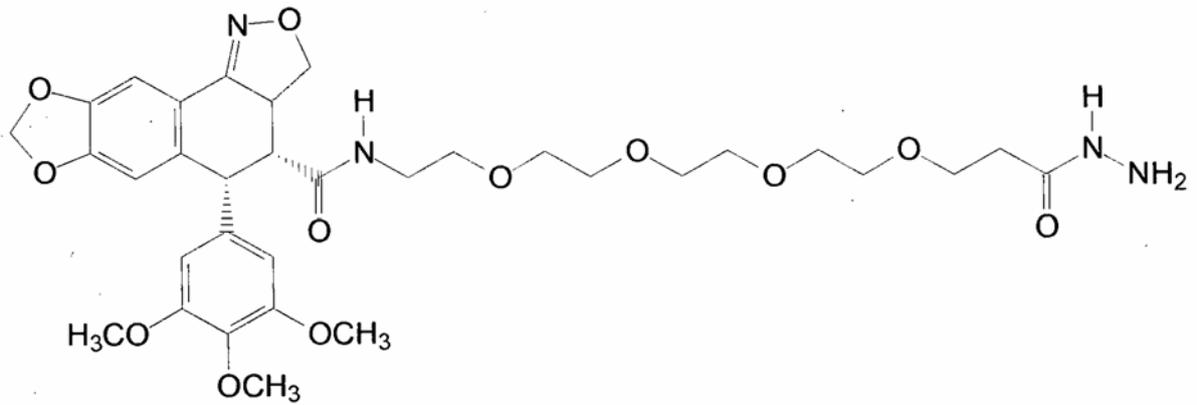




- 5 Estos ejemplos satisfacen la fórmula hapteno-L-RG, donde L es un conector PEG y el grupo reactivo es un grupo funcional de ácido carboxílico. El grupo funcional de ácido carboxílico se puede convertir en el grupo funcional reactivo diferente que se desee, como un éster activado, incluyendo los ésteres NHS que se muestran a continuación.



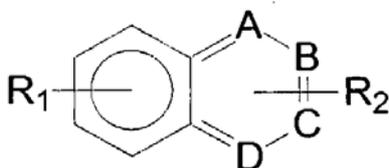
- 10 Los ésteres NHS se pueden convertir en otros grupos funcionales reactivos útiles, como hidrazida, tal como se ilustra a continuación.



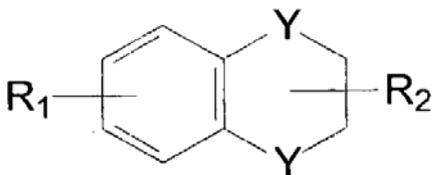
10. Conjugados de hapteno de heterobiarilo

5

Los conjugados de hapteno de heterobiarilo proporcionan otra clase de haptenos dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación. Esta clase general de haptenos tiene una primera fórmula química general que se indica a continuación:



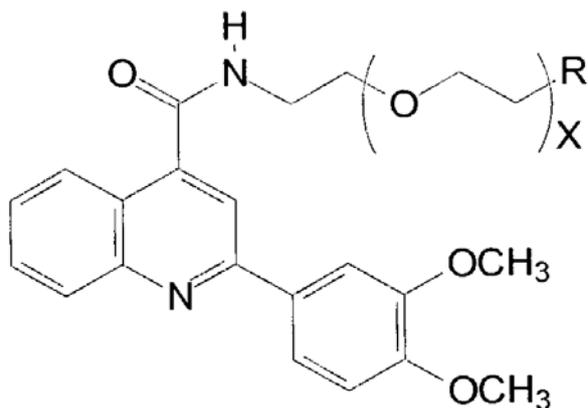
10 Con respecto a esta fórmula general, A-D se seleccionan entre carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, y más típicamente son carbono o nitrógeno.



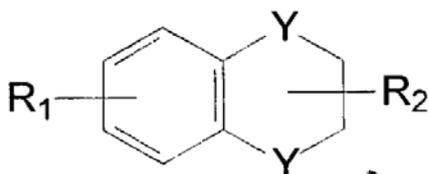
Al menos uno de los sustituyentes de R₁-R₂ está típicamente unido a un conector o un vehículo, o es un grupo

funcional reactivo capaz de reaccionar con un conector o un vehículo.

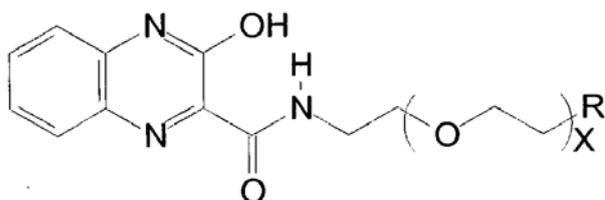
- 5 A continuación se ilustra un ejemplo concreto de un conjugado de hapteno de monoheteroatomarilo. R es típicamente hidroxilo o carboxilo. En el caso de los conjugados de hidroxilo, el grupo hidroxilo se puede convertir en un haluro, y posteriormente desplazarse utilizando una aminocarbodiimida para producir un compuesto de carbodiimida adecuado para etiquetar directamente biomoléculas. El grupo carboxilo se puede activar, como mediante la formación del haluro del ácido o éster NHS para su posterior reacción, por ejemplo con una hidrazida protegida. La síntesis de estos compuestos se describe más detalladamente a continuación.



- 10 Otra clase general de haptenos de la presente invención son los compuestos de heterobicclico/biarilo, típicamente quinolinas de fenilo y quinoxalinas, que tienen una primera fórmula química general como la indicada a continuación.



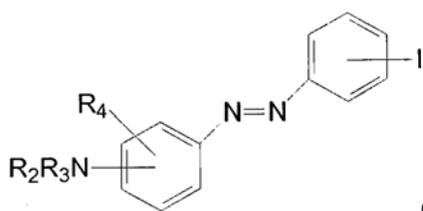
- 15 Los sustituyentes R₁-R₂ son los anteriormente indicados para esta clase de haptenos. A continuación se ilustra un ejemplo concreto de conjugado de hapteno de diheteroatomarilo.



- 20 Como en el caso de los derivados del monoheteroátomo, R es típicamente hidroxilo o carboxilo. Estos grupos funcionales se pueden utilizar para formar conjugados adicionales, tal como se divulga en el presente. R es típicamente hidroxilo o carboxilo. En el caso de los conjugados de hidroxilo, el grupo hidroxilo se puede convertir en un haluro, y posteriormente desplazarse utilizando una aminocarbodiimida para producir un compuesto de carbodiimida adecuado para etiquetar directamente biomoléculas. El grupo carboxilo se puede activar, por ejemplo mediante la formación del haluro de ácido o éster NHS para su posterior reacción, como con hidrazida protegida. La síntesis de estos compuestos se describe más detalladamente a continuación.

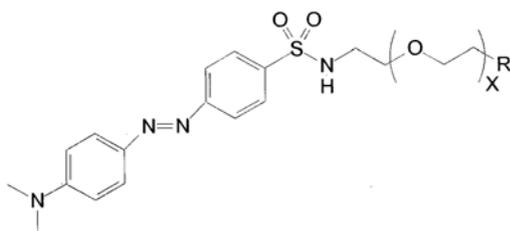
- 25 11. Conjugados de azoarilo

Determinadas realizaciones divulgadas de conjugados de hapteno de azoarilo tenían la fórmula que se proporciona a continuación.



Conector o vehículo

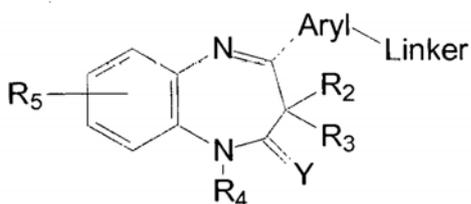
5 R₂-R₄ son los anteriormente indicados. El conector o vehículo se puede, por ejemplo, acoplar al hapteno de azoarilo mediante reacción con un haluro de sulfonilo. Una realización de este conjugado, 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida, tiene la fórmula que se proporciona a continuación.



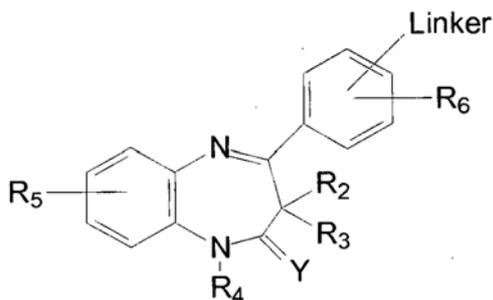
12. Conjugados de benzodiazepina

10

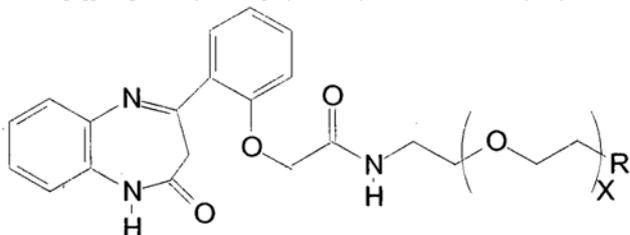
Determinadas realizaciones de los haptenos de benzodiazepina tienen R₁ arilo, tal como se muestra a continuación, donde se une un conector o vehículo al grupo arilo. Por ejemplo, los conjugados de un conector de hapteno de benzodiazepina tienen la fórmula que se indica a continuación.



15 R₂-R₅ son los indicados anteriormente. Más típicamente, estos sustituyentes se seleccionan independientemente entre alifático, particularmente alquilo, hidrógeno e hidroxilo. Determinadas realizaciones divulgadas son compuestos fenílicos, tal como se ilustra a continuación.



20 Una vez más, R₂-R₆ son los indicados anteriormente. Una realización concreta, (E)-2-(2(2-oxo-2,3-dihidror-1H-benzo[b][1,4]diazepina-4y1)fenoxi)acetamida, se proporciona a continuación.



R es típicamente hidroxilo o carboxilo. Estos grupos funcionales se pueden utilizar para formar conjugados

adicionales, tal como se divulga en el presente. R es típicamente hidroxilo o carboxilo. En el caso de los conjugados de hidroxilo, el grupo hidroxilo se puede convertir en un haluro, y posteriormente desplazarse utilizando una aminocarbodiimida para producir un compuesto de carbodiimida adecuado para etiquetar directamente biomoléculas. El grupo carboxilo se puede activar, por ejemplo mediante la formación del haluro de ácido o éster NHS para su posterior reacción, como con hidrazida protegida. La síntesis de estos compuestos se describe más detalladamente a continuación.

V. Vehículos

Un experto en la técnica reconocerá que los conjugados de un conector con un hapteno de la presente solicitud también pueden incluir un vehículo que se acopla al hapteno, o hapteno-conector, mediante un grupo funcional adecuado. Los vehículos pueden ser, a título meramente enunciativo, aminoácidos, polipéptidos, proteínas y porciones de las mismas; nucleósidos, nucleótidos, cadenas de nucleótidos, ácidos nucleicos, ADN, ARN, ARNm, etc., y combinaciones de los mismos. Típicamente las moléculas vehículo son proteínas, ADN, ARN o combinaciones de las mismas.

En documentos de patentes publicadas también se divulgan vehículos apropiados. Por ejemplo, Waggoner et al., solicitud de patente estadounidense nº 2004/0057958, que se incorpora al presente por referencia, divulga otros vehículos apropiados. Los vehículos pueden emplearse para potenciar la inmunogenicidad de un hapteno, o de cualquier otro compuesto antigénico que sea inmunogénico, no inmunogénico o ligeramente inmunogénico cuando no está asociado con el vehículo. También se pueden tener en cuenta determinadas propiedades de los potenciales vehículos a la hora de seleccionar un vehículo concreto, tales como propiedades fisicoquímicas, incluyendo el hecho de que sean no inmunogénicos, no alergénicos, no antigénicos, metabolizables, su peso molecular, solubilidad, particularmente en soluciones fisiológicas acuosas, como solución tampón de fosfato, por ejemplo, y que se puedan conjugar (p. ej., unión covalente) o asociar (p. ej. mezclarse o asociarse mediante interacciones carga-carga) con el compuesto antigénico.

Puede utilizarse un único vehículo o combinaciones de vehículos diferentes. Los diferentes vehículos incluyen, por ejemplo, polímeros de diferentes longitudes, como, por ejemplo, dos o más homopolímeros de diferentes longitudes, así como mezclas de dos o más diferentes vehículos o polímeros de la divulgación. El uso de un único vehículo exige la producción solamente de un complejo de vehículo-hapteno, mientras que el uso de múltiples vehículos resulta obviamente más difícil. El uso de más de un vehículo puede resultar beneficioso si la respuesta inmune generada contra un determinado hapteno o epítipo varía, por ejemplo por lo que respecta a su magnitud o especificidad, dependiendo del vehículo concreto utilizado, y el vehículo más adecuado se desconoce o todavía no se ha determinado experimentalmente.

El vehículo puede ser un polímero natural o sintético, sustancialmente antigénico, sustancialmente no antigénico o biodegradable, o ambas cosas. Algunos ejemplos de polímeros adecuados útiles como vehículos incluyen, a título meramente enunciativo, poli(dieno), un poli(alqueno), un poli(acrílico), un poli(metacrílico), un poli(vinil éter), un poli(vinil alcohol), una poli(vinil cetona), un poli(vinil haluro), un poli(vinil nitrilo), un poli(vinil éster), un poli(estireno), un poli(carbonato), un poli(éster), un poli(ortoéster), una poli(esteramida), una poli(anhídrida), un poli(uretano), una poli(amida), un éter de celulosa, un éster de celulosa, un poli(sacárido), poli(láctido-co-glicólido), un poli(láctido), un poli(glicólido), un copolioxalato, una policaprolactona, una poli(láctico-co-caprolactona), una poli(esteramida), un poliortoéster, un poli(a-ácido hidroxibutírico), un polianhídrido o una combinación de los mismos. En otra realización, los polímeros pueden ser un polímero u oligómero derivados de la polimerización u oligomerización de al menos un monómero seleccionado entre ácido o ácidos alfa hidroxicarboxílicos (como ácido alfa hidroxicarboxílico que comprende ácido glicólico, ácido láctico, ácido a-hidroxibutírico, ácido a-hidroxiisobutírico, ácido a-hidroxivalérico, ácido a-hidroxiisovalérico, ácido a-hidroxicaproico, ácido a-hidroxi-a-atilburítico, ácido a-hidroxiisocaproico, ácido a-hidroxi-3-metilvalérico, ácido a-hidroxiheptanoico, ácido a-hidroxi-octanoico, ácido a-hidroxidecanoico, ácido a-hidroximisristico, ácido a-hidroxiesteárico, ácido a-hidroxiligocérico), una lactona (3-propiolactona, tetrametilenglicólido, b-butirolactona, 4-butirolactona, pivalactona), un dieno, un alqueno, un acrilato, un metacrilato, un éter de vinilo, un alcohol vinílico, una cetona venilica, un haluro de vinilo, un nitrilo de vinilo, un éster de vinilo, un estireno, un carbonato, un éster, un ortoéster, una esteramida, un anhídrido, un uretano, una amida, un éter de celulosa, un éster de celulosa, un sacárido, un ácido a-hidroxicarboxílico, una lactona, una esteramida o una combinación de los mismos.

El polímero se puede obtener de uno o más aminoácidos, incluyendo tanto los homopolímeros como los heteropolímeros de los mismos. Por ejemplo, se utiliza el poliglutamato obtenido de ácido L-glumático, ácido D-glumático o mezclas, como racematos, de estos isómeros de L y D. L u/o D glutanilo, aspartilo, glicilo, serilo, treonilo, y cistenilo son todos ejemplos de aminoácidos que se pueden utilizar. El polímero también puede ser un copolímero de bloque, injerto o aleatorio. Estos incluyen, por ejemplo, copolímeros que contienen al menos otro aminoácido, como ácido aspártico, serina, tirosina, glicina, glicol de etileno, óxido de etileno (o un oligómero o polímero de cualquiera de ellos) o alcohol polivinílico. Por supuesto, el ácido glutámico puede portar uno o más sustituyentes y los polímeros incluyen aquellos en los que una parte o la totalidad de los monómeros de ácido glutámico son sustituidos. Algunos ejemplos concretos de polímeros incluyen, a título meramente enunciativo, poli(ácido glutámico 1), poli(ácido glutámico d), poli(ácido glutámico dl), poli(ácido aspártico 1), poli(ácido aspártico d), poli(ácido aspártico dl), poli(serina 1), poli(serina d), poli(serina dl), poli(tirosina 1), poli(tirosina d), poli(tirosina dl), poli(glisina 1), poli(glisina d), poli(glisina dl), poli(treonina 1), poli(treonina d), poli(treonina dl), poli(cisteína d), poli(cisteína 1), y

poli(cisteína dl). En otras realizaciones, los polímeros son copolímeros, como copolímeros de bloque, injerto o aleatorios, de los mencionados poli(aminoácidos) con glicol de polietileno, policaprolactona, ácido poliglicólico y ácido poliláctico, así como poli (2-hidroxi-etil 1-glutamina), chitosan, dextrano de carboximetilo, ácido hialurónico, albúmina sérica humana y ácido glicínico, siendo particularmente preferibles los ácidos poliglutámicos.

- 5 El peso molecular de los polímeros adecuados puede variar. Típicamente, sin embargo, el peso molecular va desde unos 1.000 kilodaltons hasta menos de 10.000.000 kilodaltons.

Algunos ejemplos de realizaciones operativas de vehículos de proteína incluyen tiroglobulina bovina, hemocianina de lapa californiana o albúmina de suero bovino.

- 10 Los conjugados de hapteno de la presente solicitud incluyen grupos funcionales reactivos para el acoplamiento del hapteno o a un vehículo, o del hapteno a un conector para formar un compuesto hapteno-conector. Para el acoplamiento de la proteína, las proteínas incluyen diversos grupos funcionales, típicamente nucleófilos que se pueden acoplar a grupos funcionales electrofílicos adecuados para formar conjugados de haptenos. Por ejemplo, se puede utilizar una amina libre (-NH₂) o una amina secundaria para acoplar la proteína al hapteno o al compuesto de hapteno-conector para formar amidas mediante reacción con ácidos carboxílicos o derivados de ácido carboxílico, como haluros de ácido (-CO), éster de succinimida, etc.; se pueden utilizar haluros de alquilo para formar aminas; se pueden utilizar compuestos de carbonilo, como cetonas y aldehídos, para formar iminas; y combinaciones de los mismos. Determinados aminoácidos incluyen otros grupos funcionales reactivos adecuados para el acoplamiento de vehículos de haptenos, incluyendo grupos reactivos de hidroxilo y/o sulfhidrilo. Algunos ejemplos de acoplamientos incluyen la formación de éster y lactona mediante reacción con un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico; la formación de éter; y combinaciones de los mismos.
- 15
20

VI. Fracciones generadoras de señales

- Los conjugados que comprenden fracciones generadoras de señales, como conjugados de fracciones de unión específica y fracciones generadoras de señales, pueden emplearse en ensayos para detectar moléculas diana concretas en muestras biológicas. La porción generadora de señales se utiliza para proporcionar una señal detectable que indica la presencia y/o ubicación de la diana. Algunos ejemplos de fracciones generadoras de señales incluyen, a título meramente enunciativo: enzimas, como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, oxidasa de glucosa, β-galactosidasa, β-glucuronidasa o β-lactamasa. La peroxidasa de rábano se utiliza ampliamente como etiqueta para inmunoglobulinas en numerosas aplicaciones de inmunoquímica diferentes, incluyendo ensayos ELISA, inmunoblots e inmunohistoquímica. Además de otras posibles realizaciones divulgadas, la peroxidasa de rábano (HRP) puede conjugarse con anticuerpos a través de varios métodos diferentes, incluyendo glutaraldehído, oxidación de periodato, a través de enlaces de disulfuro y también mediante conectores cruzados dirigidos a amino y tiol. La HRP es la más pequeña y estable de las tres etiquetas enzimáticas más populares (HRP, fosfatasa alcalina y β-galactosidasa) y su glicosilación provoca una unión no específica inferior; moléculas fluorescentes (tales como fluoresceínas, cumarinas, tintes BODIPY, resorufinas, rodaminas; otros ejemplos se pueden encontrar en The Handbook- A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Invitrogen Corporation, Eugene, OR), estructuras detectables (como estructuras fluorescentes como quantum dots, que se pueden adquirir, por ejemplo, en Invitrogen Corporation, Eugene, OR; véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses nº 6,815,064 , 6,682,596 y 6,649,138 , cada una de las cuales queda incorporada al presente por referencia), quelatos metálicos (como quelatos DOTA y DPTA de iones de metal paramagnético o radiactivo como Gd³⁺) y liposomas (como liposomas que capturan moléculas fluorescentes).
- 25
30
35
40

- Cuando la fracción generadora de señales incluye una enzima, un compuesto cromagénico, compuesto fluorogénico o compuesto luminogénico, puede utilizarse para generar una señal detectable (hay una amplia variedad de compuestos comercializados, por ejemplo, por Invitrogen, Eugene OR). Algunos ejemplos concretos de compuestos cromogénicos incluyen diaminobenzidina (DAB), 4-nitrofenilfosfato (pNPP), Fast Red, bromocloroindolil fosfato (BCIP), tetrazolio nitroazul (NBT), BCIP/NBT, Fast Red, AP Orange, AP Blue, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] (ABTS), o -dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil-α-D-galactopyranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido (X-Gluc), 3-amino-9-etil carbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.
- 45
50

- Los anticuerpos secundarios etiquetados se pueden adquirir de múltiples fuentes, incluyendo, a título meramente enunciativo, Pierce Co. Amersham and Evident Technologies, que proporciona una amplia gama de posibilidades de anticuerpos conjugados. Se pueden utilizar CyDye, EviTag Quantum Dot, fluoresceína (FITC), y rodamina. Estos conjugados abarcan diversas aplicaciones, colores y rangos de emisión. Los EviTag Quantum Dots de Evident Technologies ofrecen fotoestabilidad y fluorescencia multicolor en diversas longitudes de onda, con la ventaja sobre los fluoróforos orgánicos de una mejor fotoestabilidad, el multiplexado de colores y una única fuente de excitación. Cada EviTag genera una longitud de onda de emisión clara, lo que hace que resulten ideales para el multiplexado en entornos celulares intactos.
- 55

- El Amersham CyDyes ofrece una fotoestabilidad superior en una amplia gama de valores de pH. Para consultar un tutorial sobre marcadores fluorescentes, con las estructuras químicas de las etiquetas, véase:
- 60

<http://www.hmds.org.uk/fluorochrome.html>. Véase el enlace siguiente para consultar cómo etiquetar con haptenos:
<http://probes.invitrogen.com/handbook/boxes/2020.html>

- 5 Un tipo de conjugado detectable es un conjugado covalente de un anticuerpo y un fluoróforo. Al dirigir los fotones hacia el conjugado cuya longitud de onda es absorbida por el fluoróforo se estimula la fluorescencia, que se puede detectar y utilizar para cualificar, cuantificar y/o localizar el anticuerpo. La mayoría de las fracciones fluorescentes utilizadas como fluoróforos son moléculas orgánicas que tienen sistemas de electrones pi conjugados. A pesar de que estos fluoróforos orgánicos pueden proporcionar señales de fluorescencia intensas, presentan una serie de propiedades que limitan su eficacia, especialmente en ensayos multiplex y cuando se necesitan unos resultados de pruebas de archivo.
- 10 Los fluoróforos orgánicos pueden ser fotoblanqueados mediante iluminación prolongada con una fuente de excitación que limita el periodo de tiempo durante el que se pueden recuperar señales máximas y/o detectables de una muestra. Una iluminación y/o exposición prolongada al oxígeno puede convertir de forma permanente los fluoróforos orgánicos en moléculas no fluorescentes. Por este motivo la detección de fluorescencia no se ha utilizado de forma rutinaria cuando se necesita una muestra de archivo.
- 15 Los nanocristales semiconductores cromóforos y/o fluorescentes, también denominados quantum dots, pueden ser utilizados para identificar complejos. Los quantum dots nanocristalinos son partículas de nanocristales semiconductores y, sin limitar el alcance de la presente invención, se utilizan con partículas emisoras de luz de un tamaño determinado, que miden típicamente 2-10 nm de tamaño (aproximadamente el tamaño de las proteínas típicas). Los quantum dots son típicamente fluoróforos estables, a menudo resistentes al fotoblanqueo, que presentan un amplio rango de excitación, longitud de onda y un estrecho espectro de emisión. Se pueden seleccionar quantum dots que presenten características de emisión concretas, como emisiones a determinadas longitudes de onda, de forma que se pueda emplear una pluralidad de quantum dots diferentes que presentan características de emisión diferentes para identificar una pluralidad de dianas diferentes. Los bioconjugados de quantum dot se caracterizan por rendimientos cuánticos comparables a los tintes tradicionales más brillantes disponibles. Por otra parte, estos fluoróforos basados en quantum dots absorben entre 10 y 1.000 veces más luz que los tintes tradicionales.
- 20 La emisión de los quantum dots es estrecha y simétrica, minimizando el solapamiento con otros colores, lo que se traduce en un blanqueo mínimo de los canales de detección adyacentes y una interferencia atenuada, a pesar de que se pueden utilizar múltiples colores simultáneamente. Los espectros simétricos y ajustables se pueden modificar en función del tamaño y la composición material de las partículas, lo que permite una separación flexible y estrecha de los diferentes quantum dots sin un solapamiento espectral importante. Por otra parte, sus espectros de absorción son amplios, lo que permite excitar todas las variantes de colores de los quantum dots de forma simultánea, utilizando una única longitud de onda de excitación, minimizando de este modo la autofluorescencia de la muestra.
- 25 Por otra parte, se ha descubierto que la pegilación, la introducción de grupos de glicol de polietileno en los conductos de los quantum dot, puede reducir de forma significativa la interacción entre proteína no específica y quantum dot. Hay diversos quantum dots disponibles en el mercado, como los de Quantum Dot Corp., de Hayward, California, e Invitrogen.
- 30 Los microscopios de fluorescencia estándar son una herramienta económica para la detección de bioconjugados de quantum dot. Dado que los conjugados de quantum dot son prácticamente fotoestables, se puede emplear tiempo a buscar regiones de interés y enfocar correctamente las muestras con el microscopio. Los conjugados de quantum dot son útiles siempre que se necesita una emisión fotoestable y particularmente útiles en aplicaciones multicolor en las que solo se dispone de un filtro/fuente de excitación y se precisa una interferencia mínima entre los colores. Por ejemplo, se han empleado quantum dots para formar conjugados de estreptavidina e IgG para etiquetar marcadores de la superficie celular y antígenos nucleares, así como para teñir microtúbulos y actina (Wu, X. et al. (2003). Nature Biotech. 21, 41-46).
- 35 Por ejemplo, la fluorescencia se puede medir con el sistema de captura de imagen multiespectral Nuance™ (Cambridge Research & Instrumentation, Woburn, MA). Otro ejemplo de sistema para medir la fluorescencia es el sistema de captura de imagen espectral SpectrView™ (Applied Spectral Imaging, Vista, CA). La captura de imagen multiespectral es una técnica en la que se recoge la información espectroscópica de cada píxel de una imagen y los datos resultantes se analizan con un software de procesamiento de imágenes espectrales. Así, por ejemplo, el sistema Nuance puede tomar una serie de imágenes a diferentes longitudes de onda que son electrónica y constantemente seleccionables para, a continuación, utilizarlas con un programa de análisis diseñado para manejar estos datos. El sistema Nuance puede obtener información cuantitativa de múltiples tintes de forma simultánea, incluso cuando los espectros de los tintes se solapan de forma significativa o se encuentran colocalizados, o se producen en el mismo punto de la muestra, siempre que las curvas espectrales sean diferentes. Son muchos los materiales biológicos que presentan autofluorescencia o que emiten una luz de menor energía cuando se excitan con una luz de energía superior. La señal puede traducirse en datos e imágenes de menor contraste. Las cámaras de alta sensibilidad sin capacidad de captura de imágenes multiespectrales solamente incrementan la señal de autofluorescencia a lo largo de la señal de fluorescencia. La captura de imágenes multiespectrales puede separar la autofluorescencia del tejido, incrementando así el ratio de señal/ruido.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Los haptenos se pueden conjugar con quantum dots, para estimular la fluorescencia de estos últimos, por ejemplo mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), de forma que la luz de longitud de onda corta estimula la fluorescencia de los quantum dots. Invitrogen ha determinado que los quantum dots conjugados con biotina tenían un límite de detección 100 veces menor para el derivado de biotina biocitina que para Anti-Biotin Alexa Fluor. Los quantum dots plenamente biotinilados fueron 10 veces menos sensibles que los quantum dots con una cobertura de biotina del 25%.

El uso de quantum dot ha sido limitado hasta la fecha, debido a su ausencia de biocompatibilidad. No obstante, los nuevos avances en la química de revestimiento de superficies han contribuido a superar estos problemas. Véase, por ejemplo, Wu, X. et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nature Biotechnol.* 21, 41-46 (2003); Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M. & Simon, S. M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nature Biotechnol.* 21, 47-51 (2003); y Dubertret, B. et al. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298, 1759-1762 (2002).

Los quantum dots también se han conjugado con moléculas de biorreconocimiento (Id.), como la estreptavidina. Estos conjugados se han utilizado tanto en células fijadas como en secciones de tejido. Por otra parte, se han etiquetado con bioconjugados de quantum dots las proteínas de la superficie celular y los compartimentos endocíticos de células vivas.

Las proteínas fluorescentes también se pueden utilizar como vehículo o acoplarse a un vehículo para facilitar la visualización. Por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP) se aisló originalmente del órgano emisor de luz de la medusa *Aequorea victoria*. Las fusiones de GFP quiméricas se pueden expresar in situ mediante la transferencia del gen a las células y se pueden localizar en sitios concretos de la célula mediante las señales especializadas apropiadas. Se han conseguido generar variantes espectrales con emisión azul, cian y amarillo verdoso a partir de la GFP de *Aequorea*, aunque ninguna presenta límites de emisión superiores a 529 nm. Se han aislado proteínas similares a GFP de Anthozoa (corales) que han ampliado de forma notable la gama de colores disponible para aplicaciones biológicas. La familia de "proteínas similares a GFP" actualmente incluidas en bases de datos de secuencias se compone de unos 30 miembros notablemente diferentes. Por proteínas fluorescentes se entiende las proteínas que pueden volverse fluorescentes de forma espontánea mediante la síntesis autocatalítica de un cromóforo.

Las proteínas que presentan fluorescencia a las longitudes de onda del rojo o rojo lejano (proteínas fluorescentes rojas o RFP) son conocidas. Las RFP se pueden utilizar en combinación con otras proteínas fluorescentes que presentan fluorescencia a longitudes de onda inferiores, tanto en experimentos de etiquetado multicolor como de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Las RFP disponibles en el mercado se obtienen de dos proteínas similares a las GFP naturales. DsRed (drFP583) tiene unos límites máximos de excitación y emisión a 558 nm y 583 nm, respectivamente. Una proteína fluorescente rojo lejano se generó mediante mutagénesis de una cromoproteína que absorbe a 571 nm. HcRed1 (Clontech) tiene unos límites máximos de excitación y emisión a 588 nm y 618 nm, respectivamente. La proteína fluorescente que emite fluorescencia a la longitud de onda más larga (sin la introducción de ninguna mutación) es eqFP611, clonada de la anémona *Entacmaea quadricolor*. La proteína absorbe a 559 nm y emite a 611 nm. Dado que han surgido numerosas variantes espectrales, cada vez más investigadores están interesados en la captura de imágenes simultáneas de múltiples fluoróforos y/o señales FRET.

También se pueden utilizar proteínas de fusión para formar conjugados de haptenos de la presente divulgación. A la hora de crear una proteína fluorescente funcional, hay al menos tres puntos que se deben tener en cuenta: la proteína fluorescente debe plegarse correctamente para emitir fluorescencia; la proteína hospedadora debe plegarse correctamente para ser funcional; y la integridad de la proteína quimérica se debe mantener.

La longitud y secuencia de cualquier conector entre la proteína fluorescente y la proteína hospedadora se deben optimizar para cada aplicación específica. Los diseños de conector más utilizados tienen secuencias que se componen principalmente de tramos de glicina (Gly) y serina (Ser), intercalándose los residuos de Ser para mejorar la solubilidad de un tramo poli-Gly.

La decisión de si fusionar una proteína fluorescente con el extremo amino o carboxilo de una proteína depende de las propiedades de la proteína. Por ejemplo, podría ser necesario preservar un extremo concreto para mantener la función apropiada de la proteína o garantizar una localización correcta. La decisión también se podría tomar en base a aspectos estructurales de la proteína fluorescente concreta. Por ejemplo, la GFP de *Aequorea* tiene una cola carboxi-terminal flexible de unos 10 aminoácidos, lo que hace posible su fusión con el extremo amino de otras proteínas sin la adición de un conector. Por lo contrario, DsRed se fusiona mejor con el extremo carboxi-terminal de las proteínas de interés, porque los términos amino se proyectan plenamente desde un complejo tetramérico de DsRed. Si ninguno de los extremos de una proteína hospedadora se puede modificar, se puede insertar la proteína fluorescente en medio de la proteína.

Recientemente se han desarrollado Citrina y Venus, dos versiones brillantes de un mutante de la GFP que emite luz amarilla (YFP) que maduran eficazmente.

Dos variedades recientemente desarrolladas de DsRed, conocidas como T1 y E57, despliegan una maduración mejorada, lo que hace que resulten preferibles para su uso en experimentos a dos colores.

5 La fluorescencia de algunas variantes de GFP puede ser "fotoactivada" mediante una iluminación específica, que ofrece la ventaja de que la fluorescencia se puede activar en un punto temporal seleccionado. Se han desarrollado tres proteínas fluorescentes que se someten a modificación fotoquímica en el cromóforo o cerca de este, PA-GFP, Kaede y KFP1, que permiten la activación selectiva de señales de fluorescencia tras una iluminación específica y que se pueden utilizar para marcar por fluorescencia células, organelos o proteínas individuales.

La Tabla 1 proporciona otros ejemplos de fracciones generadoras de señales y conjugados que comprenden estas fracciones.

10

Tabla 1

Ejemplos de conjugados de etiqueta detectable de anticuerpo

Etiqueta de conjugado de anticuerpo	Recomendado para	Color emitido	Excitación de etiqueta	Emisión de etiqueta
Lake Placid Blue (EviTag™ Quantum Dot)	Citometría de flujo, inmunoblots y microscopía de fluorescencia		<450	490
Fluoresceína (es decir, FITC)	Citometría de flujo, incl. sistemas BD FAC y Guava System, y microscopía de fluorescencia		494	518
Adirondack Green (EviTag™ Quantum Dot)	Citometría de flujo, inmunoblots y microscopía de fluorescencia		<450	520
Rhodamine Green	Microscopía de fluorescencia		502	527
Catskill Green (EviTag™ Quantum Dot)	Microscopía de fluorescencia		<450	540
Rodamina 6G	Citometría de flujo, inmunoblots y microscopía de fluorescencia		525	555
Hops Yellow (EviTag™ Quantum Dot)	Citometría de flujo, inmunoblots y microscopía de fluorescencia		<450	560
Amersham Cy3	Microscopía de fluorescencia		550	565
R-Phycoerythrin (PE)	Citometría de flujo, sistemas Luminex® y Guava, ensayos de FRET, electroforesis capilar y uso con FITC para doble etiquetado		(495)565	575

Rhodamine Red	Citometría de flujo, microscopía de fluorescencia		560	580
Birch Yellow (EviTag™ Quantum Dot)	Microscopía de fluorescencia		<450	580
Amersham Cy3.5	Microscopía de fluorescencia		581	596
Fort Orange (EviTag™ Quantum Dot)	Citometría de flujo, inmunoblots y microscopía de fluorescencia		<450	600
SulfoRhodamine (Alias Texas Red®)	Citometría de flujo y microscopía de fluorescencia		596	615
Amersham Cy5	Immunoblot, incl. Amersham Typhoon System, y aplicaciones inmunofluorescentes		650	670
Allophycocyanin (APC)	Ensayos FRET y ensayos HTRF		652	670
Amersham Cy5.5	Immunoblot, especialmente sistemas LI-COR Odyssey		675	694
Biotina	Citometría de flujo y otras aplicaciones fluorescentes		-	

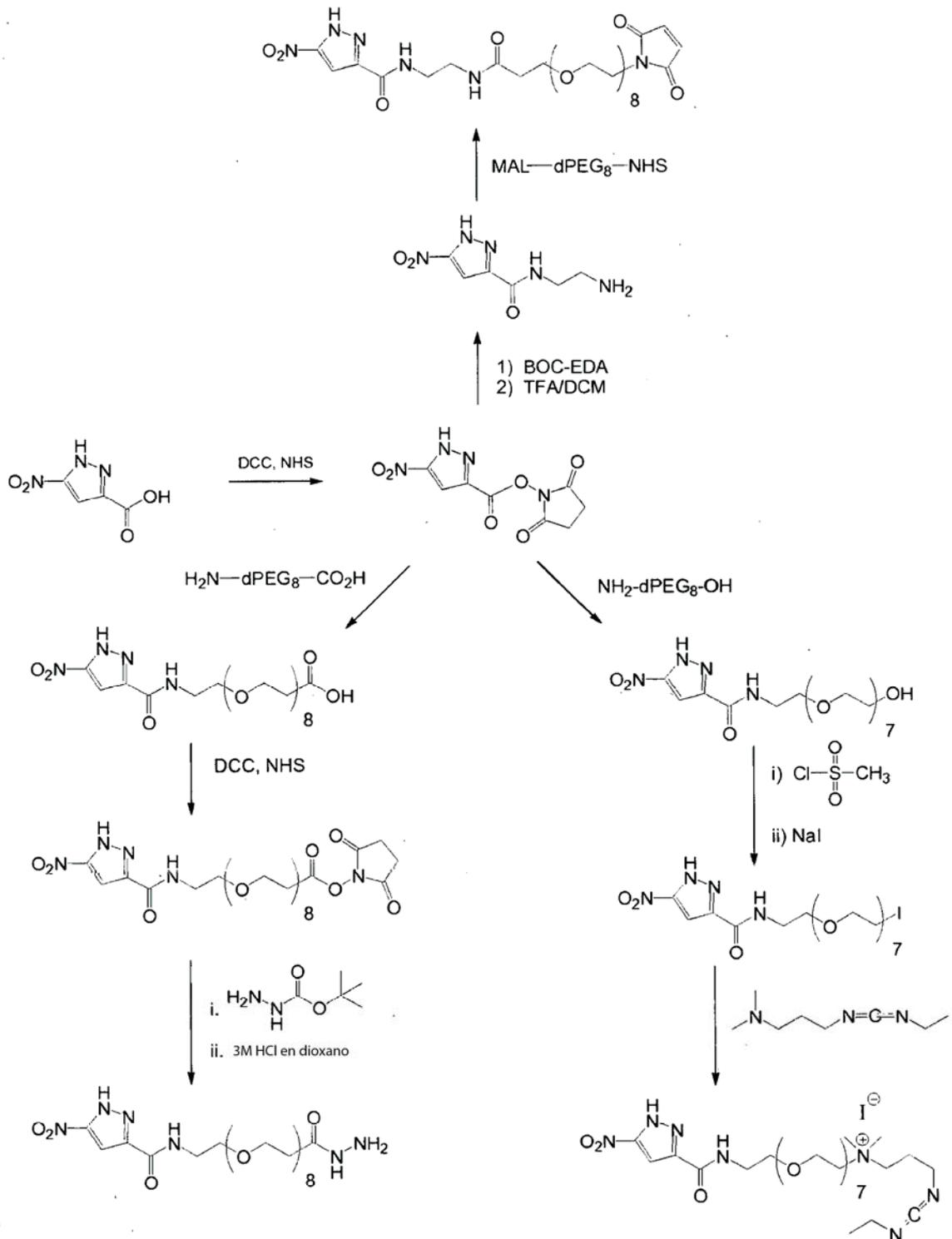
Muchas de estas etiquetas se pueden utilizar con múltiples anticuerpos que no interaccionan para crear ensayos multiplexados personalizados.

VII. Procesos para la formación de conjugados de hapteno - Esquemas de reacción

- 5 Los siguientes esquemas proporcionan ejemplos de realizaciones de un método útil para producir conjugados de la presente realización. Otras metodologías sintéticas también resultan útiles para producir estos conjugados y no se deberá interpretar que los esquemas siguientes limitan el método a las metodologías sintéticas concretas ilustradas.

1. Conjugados de nitropirazol

- 10 El Esquema 1 ilustra un método adecuado para acoplar ejemplos de haptenos de nitropirazol a un conector de óxido de alquileo y posteriormente a un vehículo de proteína.



Esquema 1

El Esquema 1 ilustra el acoplamiento de un ejemplo de hapteno de nitropirazol a un ejemplo de conector de glicol de etileno a través de un grupo funcional de ácido carboxílico pendiente. El primer paso consiste en formar un éster N-hidroxisuccinimida (NHS) a partir de nitropirazol. Esto "activa" el éster para la posterior reacción con un nucleófilo. La formación del éster de NHS se consiguió en realizaciones operativas utilizando diciclohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo de acoplamiento. Se utilizó diclorometano como solvente y se añadió trietilamina como base. El éster de NHS está entonces preparado para el acoplamiento a un nucleófilo.

5

Una primera vía sintética posible consiste en hacer reaccionar el éster activado con una diamina para producir una amida que tiene una amina terminal. La diamina puede ser una diamina protegida, tal como se ilustra en el Esquema

10

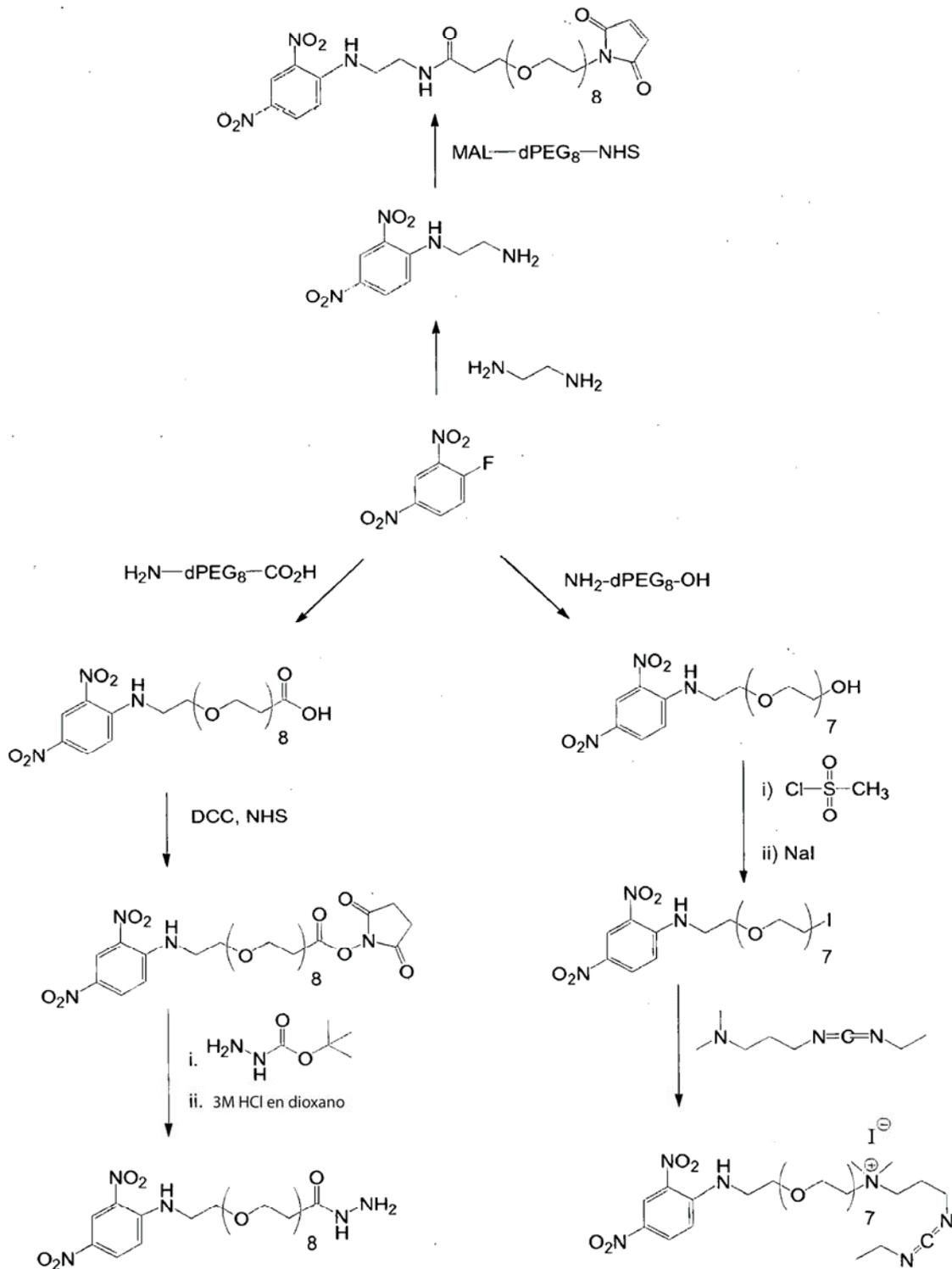
1, donde se utiliza el compuesto de diamina del etileno-BOC. A continuación, se desprotege la amida protegida por BOC utilizando ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano. El compuesto desprotegido se puede hacer reaccionar entonces con un éster de maleimida-PEG-NHS para acoplar un conector al hapteno. El conector también incluye un grupo funcional reactivo en el extremo terminal.

- 5 Otra alternativa es que el hapteno que tiene un éster activado se puede acoplar con un conector para formar una amida que presenta un grupo funcional de ácido carboxílico terminal o un grupo hidroxilo terminal. Se puede realizar una segunda reacción de acoplamiento de DCC para activar una vez más el grupo funcional de ácido carboxílico, que se hace reaccionar con el reactivo de hidrazina protegido ilustrado. La desprotección del ácido hidrocórico produjo la hidrazida ilustrada. Alternativamente, el conector PEG-hapteno de nitropirazol que tiene un grupo
- 10 funcional pendiente de éster activado es adecuado para la reacción con una proteína vehículo, para formar un inmunógeno.

- Otra vía sintética alternativa se ilustra utilizando el conector PEG-hapteno que tiene un grupo hidroxilo terminal. El compuesto que tiene el grupo hidroxilo terminal se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido por la
- 15 reacción con yoduro para proporcionar el derivado de yodo sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con la carbodiimida de amina de dimetilo ilustrada para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

2. Conjugados de nitrofenilo

- El Esquema 2 ilustra ejemplos de haptenos de dinitrofenilo acoplados a un conector (PEG) de óxido de alquileo.
- 20 Estos conjugados de conector-hapteno se pueden derivatizar posteriormente como se desee o acoplarse directamente a un vehículo.

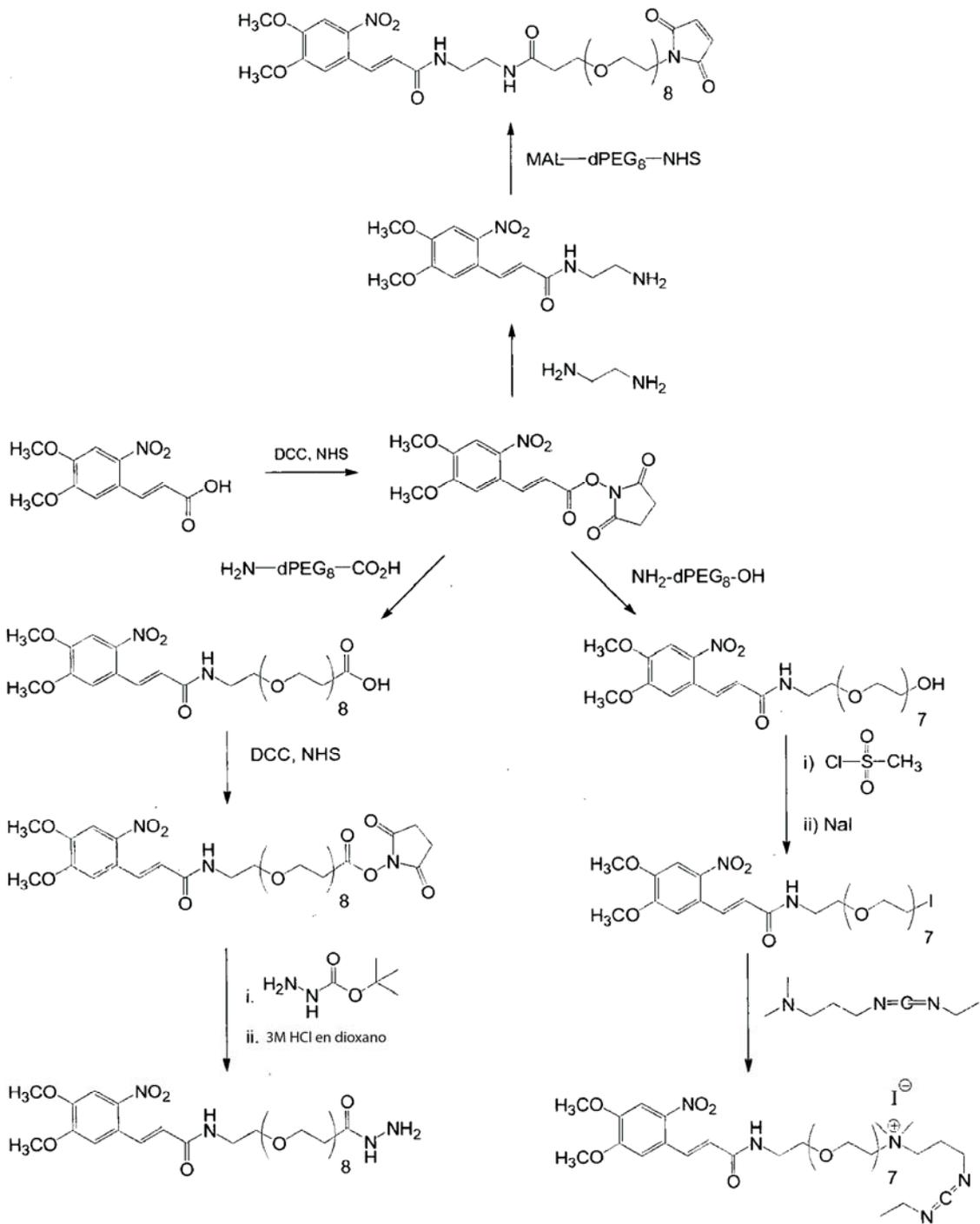


Esquema 2

5 El ejemplo de hapteno de dinitrofenilo se acopló con un conector de óxido de alqueno, concretamente un glicol de polietileno bifuncional que tiene tanto una amina como un ácido libre pendientes. En un primer planteamiento, el hapteno de dinitrofenilo se acopló con diamina de etileno mediante sustitución, con la posición del anillo ocupada por fluoruro activada para la sustitución nucleofílica mediante la presencia de los grupos orto y para-nitro. El compuesto resultante incluye una amina nucleofílica terminal para el acoplamiento a un éster de maleimida-PEG-NHS.

Alternativamente, el hapteno de dinitrofenilo se puede hacer reaccionar con un compuesto PEG-amino que tiene un grupo hidroxilo o un ácido carboxílico terminal. Con respecto al derivado de ácido carboxílico, este compuesto se

- 5 hizo reaccionar con el hapteno de dinitrofenilo para sustituirlo por fluoruro. A continuación se formó un éster de NHS utilizando DCC en diclorometano. El éster activado resulta adecuado para la derivatización deseada, por ejemplo mediante reacción con el reactivo de hidrazina protegida ilustrado, seguida de la desprotección utilizando un ácido, como ácido hidroclicórico o trifluoracético. Alternativamente, el éster activado es adecuado para el acoplamiento a una proteína vehículo para formar un inmunógeno.
- 10 Otra alternativa más consiste en hacer reaccionar el hapteno de dinitrofenilo con un conector PEG-amino para producir un compuesto con un grupo hidroxilo terminal. El compuesto con el grupo hidroxilo terminal se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguida de una reacción con yoduro para proporcionar un derivado de yodo sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con la carbodiimida de amina de dimetilo ilustrada para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.
- 15 Un segundo ejemplo de una vía sintética para producir conjugados a base de cinnamida se proporciona a continuación, en el Ejemplo 3. El ejemplo de hapteno de nitrofenilo se convirtió al correspondiente éster de NHS utilizando DCC. El éster de NHS se hizo reaccionar con diamina de etileno. El compuesto resultante incluye una amina nucleofílica terminal para el acoplamiento a un éster de maleimida-PEG-NHS.
- 20 Alternativamente, el hapteno de nitrofenilo se puede hacer reaccionar con un compuesto PEG-amino que tiene un grupo hidroxilo o un ácido carboxílico terminal. Con respecto al derivado de ácido carboxílico, este compuesto se hizo reaccionar con nitrofenilo. A continuación se formó un éster de NHS utilizando DCC en diclorometano. El éster activado es adecuado para la derivatización deseada, por ejemplo mediante reacción con el reactivo de hidrazina protegida ilustrado, seguida de la desprotección en ácido hidroclicórico. Alternativamente, el éster activado es adecuado para el acoplamiento a una proteína vehículo para formar un inmunógeno.
- 25 Otra alternativa consiste en hacer reaccionar el hapteno de nitrofenilo con un conector PEG-amino para producir un compuesto que tiene un grupo hidroxilo terminal. El compuesto con el grupo hidroxilo terminal se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguida de una reacción con yoduro para proporcionar un derivado de yodo sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con la carbodiimida de amina de dimetilo ilustrada para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

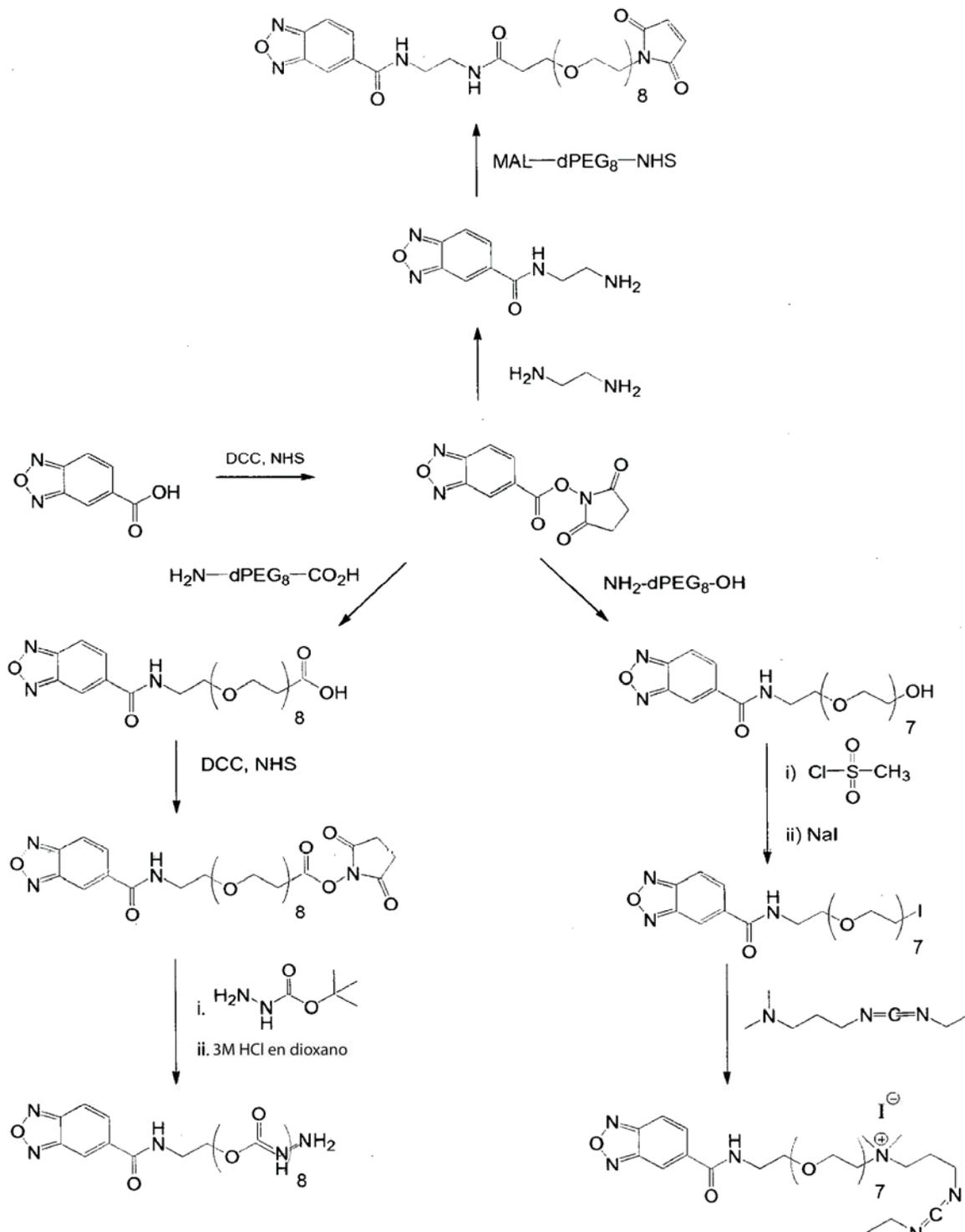


5

Esquema 3

3. Conjugados de benzofurazano

El Esquema 4 ilustra un metodolías sintéticas para acoplar ejemplos de haptenos de benzofurazano a un conector de óxido de alqueno



Esquema 4

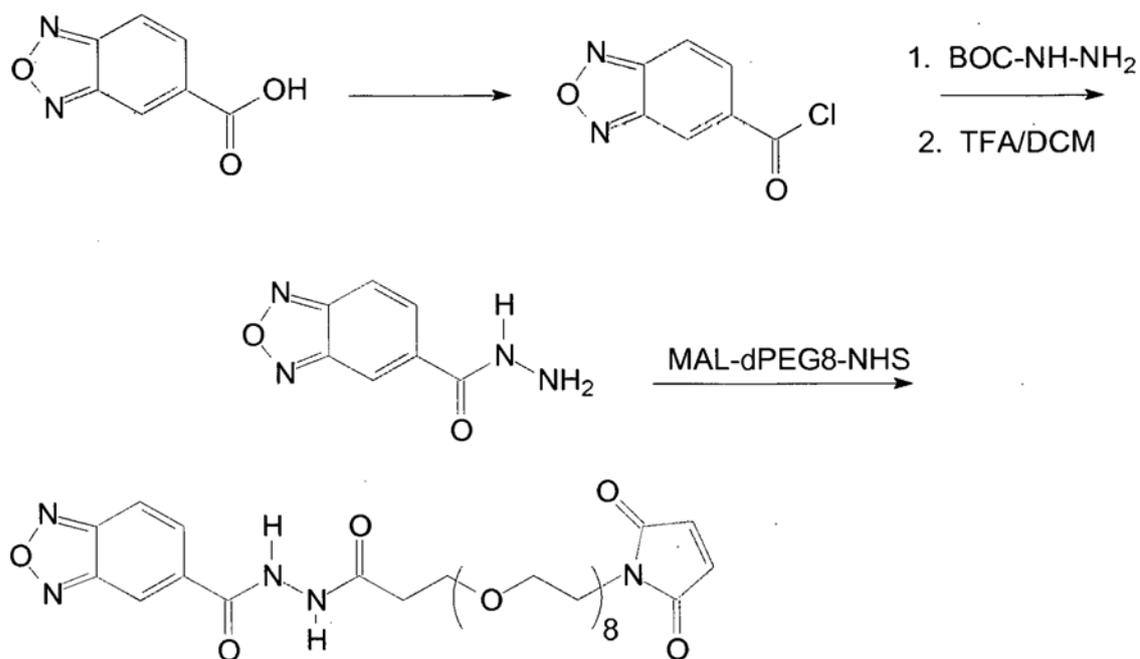
- 5 Con respecto al Esquema 4, el ejemplo de hapteno de benzofurazano incluye un grupo funcional de ácido carboxílico. El primer paso es la activación del grupo funcional de ácido carboxílico mediante reacción con NHS, utilizando DCC como agente de acoplamiento para formar un éster activado, o mediante formación de un cloruro de ácido. Como primera opción, el éster activado se puede hacer reaccionar con una diamina para producir una amina terminal. En determinadas realizaciones, la diamina es una diamina protegida, como una diamina protegida por BOC, tal como se ilustra más adelante en el esquema 5. Tras la reacción de acoplamiento, el grupo protegido por BOC se puede retirar en ácido, como ácido trifluoroacético. El compuesto desprotegido se hace reaccionar después con un éster de maleimida-PEG-NHS para acoplar un conector al hapteno.

10

Como segunda alternativa ilustrada por el Esquema 4, el éster activado está ahora preparado para el acoplamiento con un conector, si se desea, como los ejemplos de conectores de óxido de alquileo bifuncionales, es decir conectores PEG. Los ejemplos de conectores PEG pueden tener tanto una amina y un grupo de ácido carboxílico como una amina y un grupo hidroxilo. La reacción del compuesto de éster activado con el conector proporciona un compuesto terminado en ácido carboxílico o un compuesto terminado en un grupo hidroxilo. El ácido carboxílico se puede convertir en un éster activado mediante reacción con NHS utilizando DCC como agente de acoplamiento. Este éster activado se puede hacer reaccionar con el reactivo de hidrazina protegida ilustrado, seguido por la desprotección en ácido hidrocórico.

5 Alternativamente, el compuesto terminado en hidroxilo se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido por una reacción con yoduro para proporcionar el compuesto de yodo sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con la carbodiimida de amina de dimetilo ilustrada para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

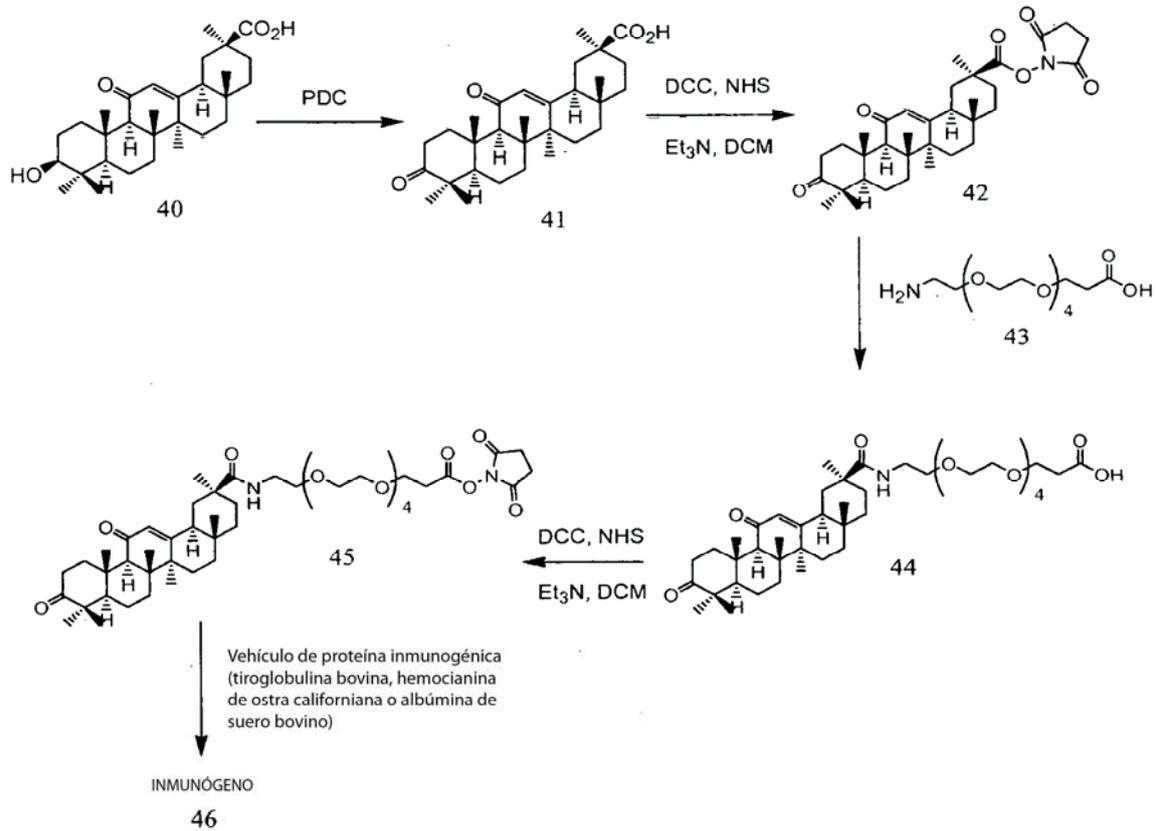
15 Otra vía de síntesis alternativa para producir un conjugado de maleimida-dPEG8 se proporciona a continuación en el Esquema 5. El cloruro de ácido se hace reaccionar después con una hidrazida protegida por BOC, seguida de una desprotección utilizando ácido trifluoroacético. La hidrazida se hace reaccionar a continuación con maleimida-dPEG8-NHS para producir el conjugado ilustrado.



Esquema 5

4. Conjugados de conector-triterpeno e inmunógenos de triterpeno

20 El Esquema 6 ilustra un método adecuado para el acoplamiento de ejemplos de haptenos de triterpeno con un conector de óxido de alquileo para formar conjugados de conector-hapteno. Los conjugados de conector-hapteno se puede derivatizar posteriormente como se desee o se pueden acoplar directamente a una molécula vehículo de proteína.

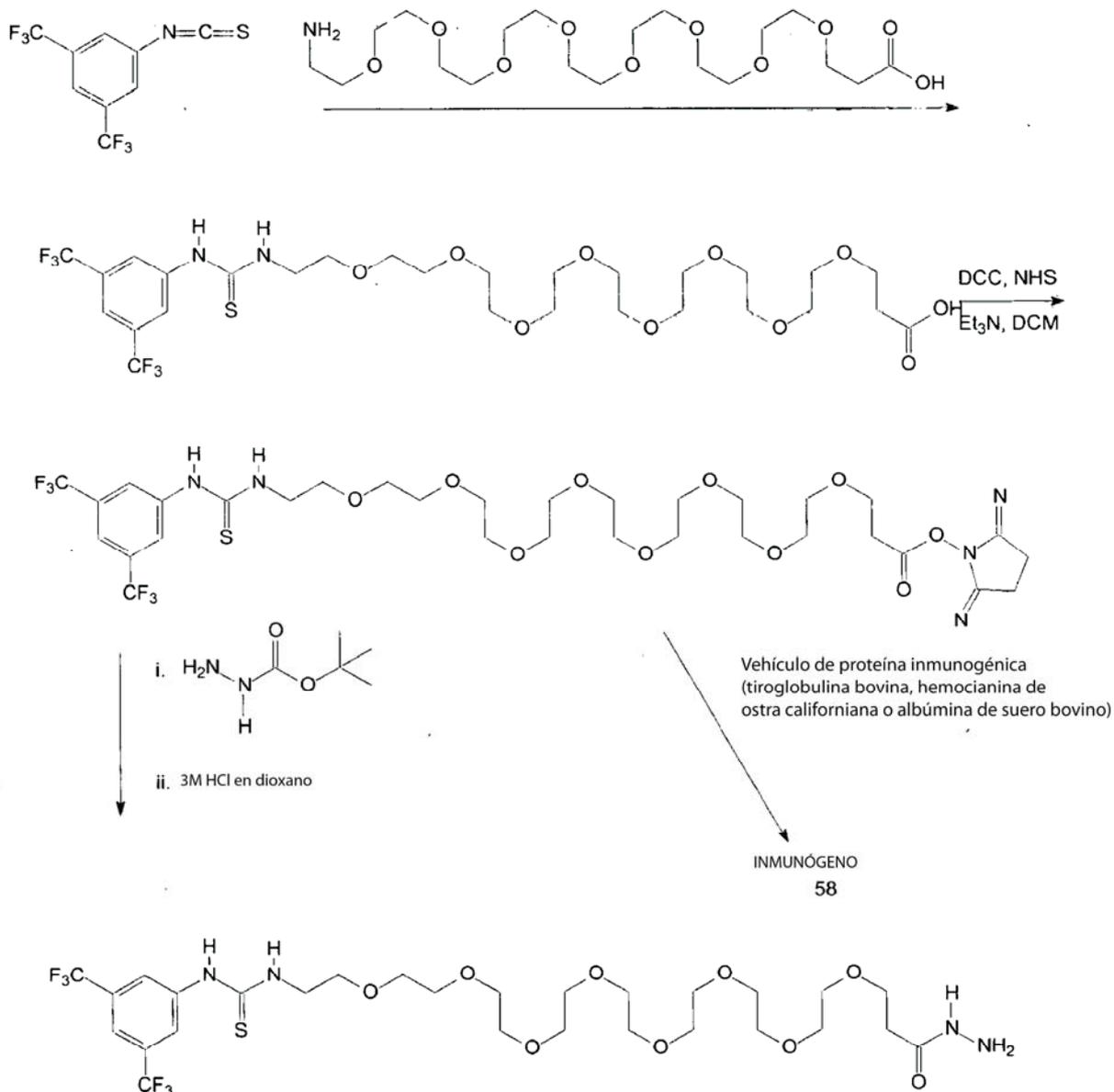


Esquema 6

Con respecto al Esquema 6, el compuesto de partida 40 se oxidó con cetona 41 utilizando dicromato de piridinio (PDC). El éster activado de NHS 42 se formó después utilizando el acoplamiento de DCC en diclorometano. El éster activado 42 se hizo reaccionar después con un conector PEG-4 bifuncional 43 que comprendía tanto una amina como un grupo funcional de ácido carboxílico para formar la amida 44. El grupo funcional de ácido carboxílico del compuesto 44 se convirtió al éster activado 45 de nuevo, utilizando NHS y DCC. El éster activado 45 se acopló después a un vehículo de proteína inmunogénica para producir el inmunógeno 46.

5. Conjugados de conector-hapteno basado en urea y tiourea e inmunógenos

10 El Esquema 7 ilustra un método apropiado para el acoplamiento de ejemplos de haptenos basados en urea y tiourea a un conector de óxido de alquileo y posteriormente a una molécula vehículo de proteína.

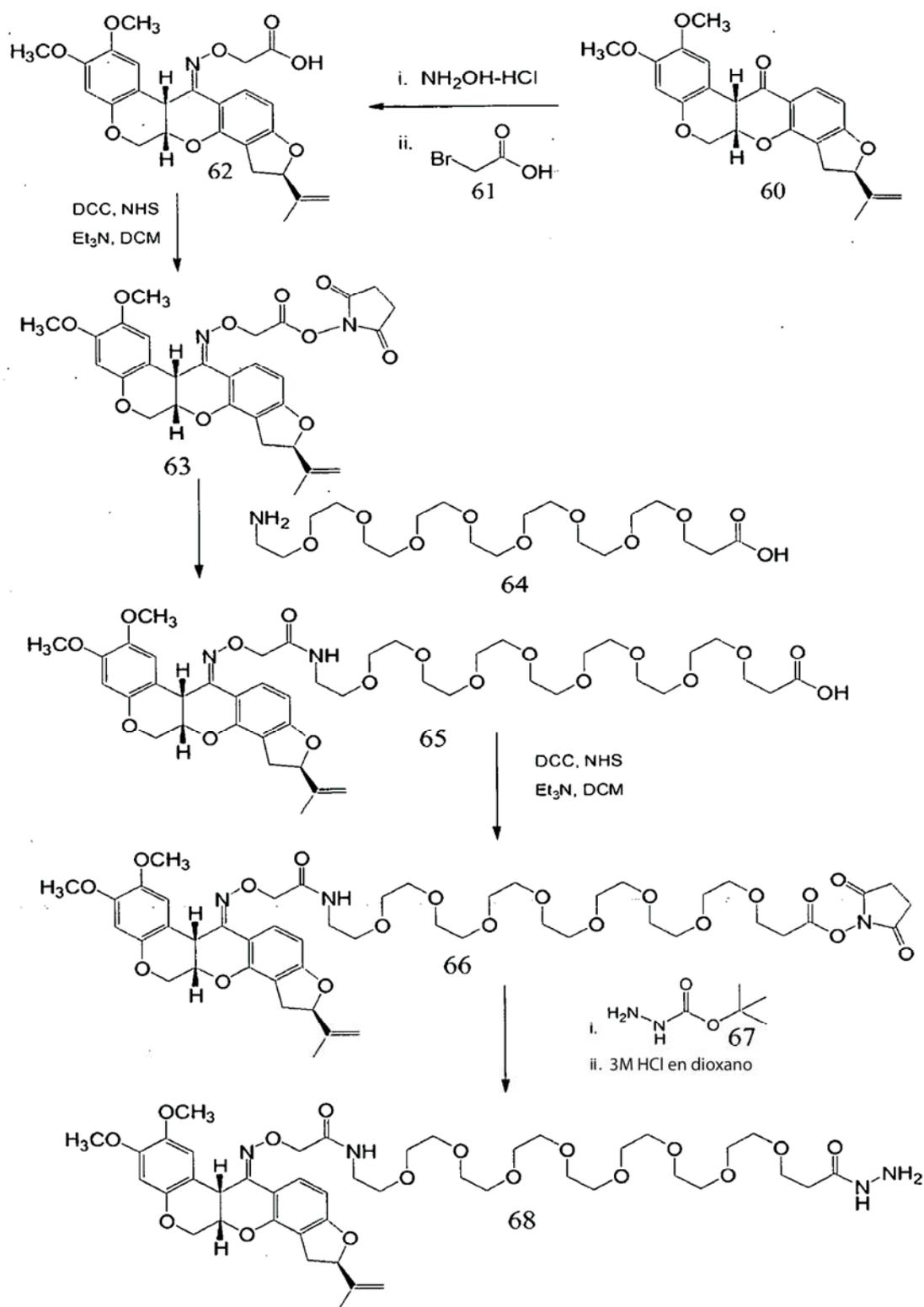


Esquema 7

Con respecto al Esquema 7, el compuesto de isotiocianato de partida 51 se hizo reaccionar con un conector PEG-4 52 que comprendía tanto una amina como un grupo funcional de ácido carboxílico para formar tiourea 53. El grupo funcional de ácido carboxílico del compuesto 53 se convirtió al éster activado 54 utilizando NHS y DCC. El éster activado 54 se acopló después al reactivo de hidrazina protegida 55, seguido de la desprotección en ácido hidroclicórico 3M, para formar un compuesto 56. Alternativamente, el éster activado 54 se puede acoplar a un vehículo para formar un inmunógeno 58.

6. Conjugados de conector-hapteno basado en rotenona e inmunógenos

El Esquema 8 ilustra un método adecuado para el acoplamiento de ejemplos de haptenos basados en rotenona con un conector de óxido de alqueno y posteriormente con una molécula vehículo de proteína

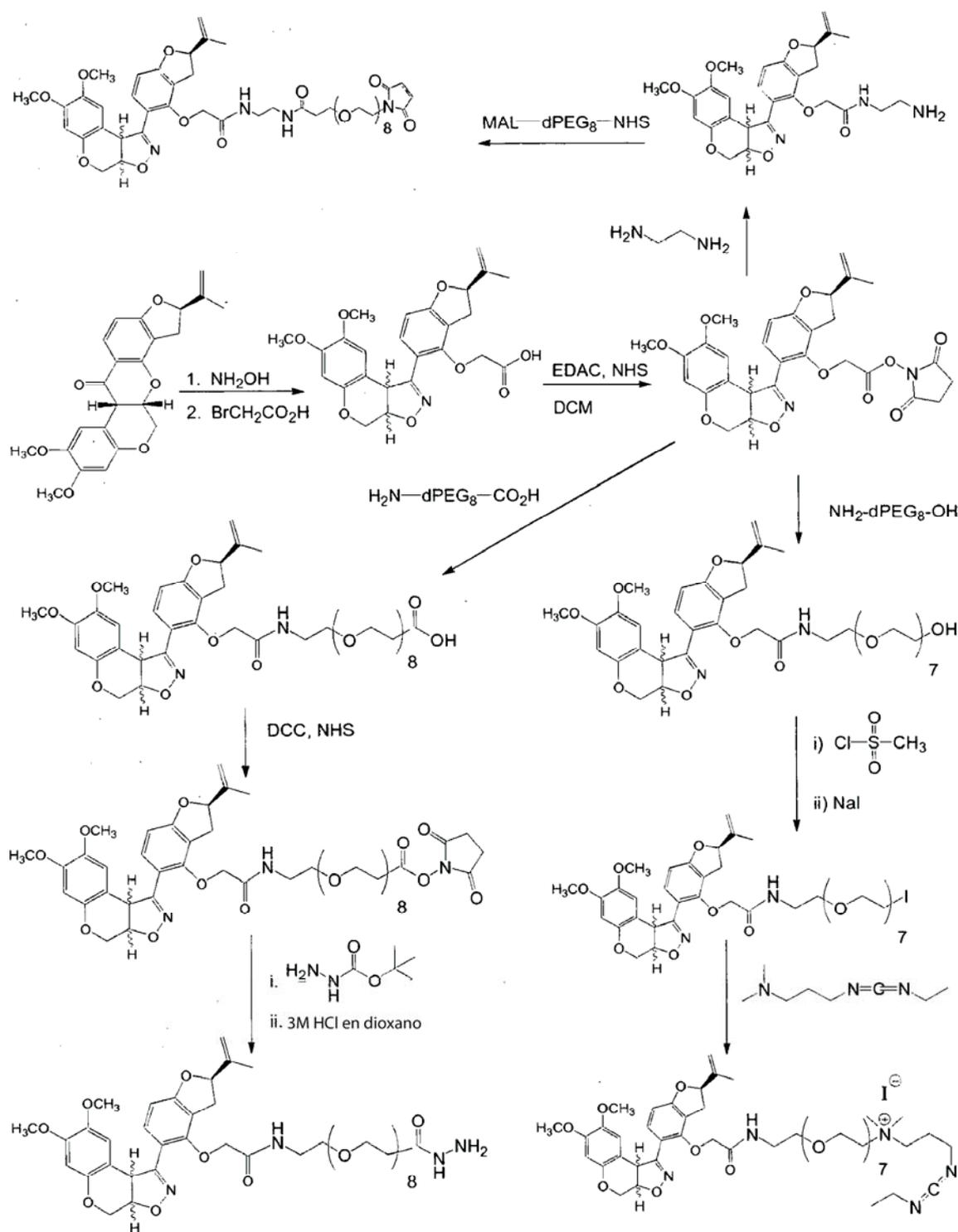


Esquema 8

El compuesto de partida 60 fue tratado con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ para formar una oxima intermedia, que después se hizo reaccionar con ácido bromoacético alfa, compuesto 61, para formar la oxima 62. El grupo funcional de ácido carboxílico del compuesto 62 se convirtió en un éster de NHS utilizando DCC para formar el compuesto 63. El compuesto 63 se acopló después con un ejemplo de conector PEG-4 64, que tenía tanto una amina como un grupo funcional de ácido carboxílico, para producir un compuesto 65. El grupo funcional de ácido carboxílico del compuesto 65 se convirtió al éster de NHS 66 mediante reacción con NHS utilizando DCC como agente de acoplamiento. El compuesto 66 se trató entonces con un compuesto de hidrazina protegida por BOC 67 y después

se desprotegió utilizando ácido hidrocórico 3M en dioxano, para producir el compuesto 68. Un experto en la técnica apreciará que el compuesto 66 también se podría acoplar a un vehículo, como un vehículo de proteína, tal como se divulga en el presente para formar un inmunógeno.

El Esquema 9 ilustra las vías sintéticas utilizadas con isoxazolininas de rotenona.



5

Esquema 9

El Esquema 9 ilustra la producción de conjugados de isoxazolinina de rotenona mediante el tratamiento secuencial del compuesto de partida con hidróxido de amonio, seguido de ácido bromoacético. Esto provoca la redistribución del anillo para producir isoxazolininas de rotenona que tienen un grupo funcional de ácido carboxílico terminal. El éster de

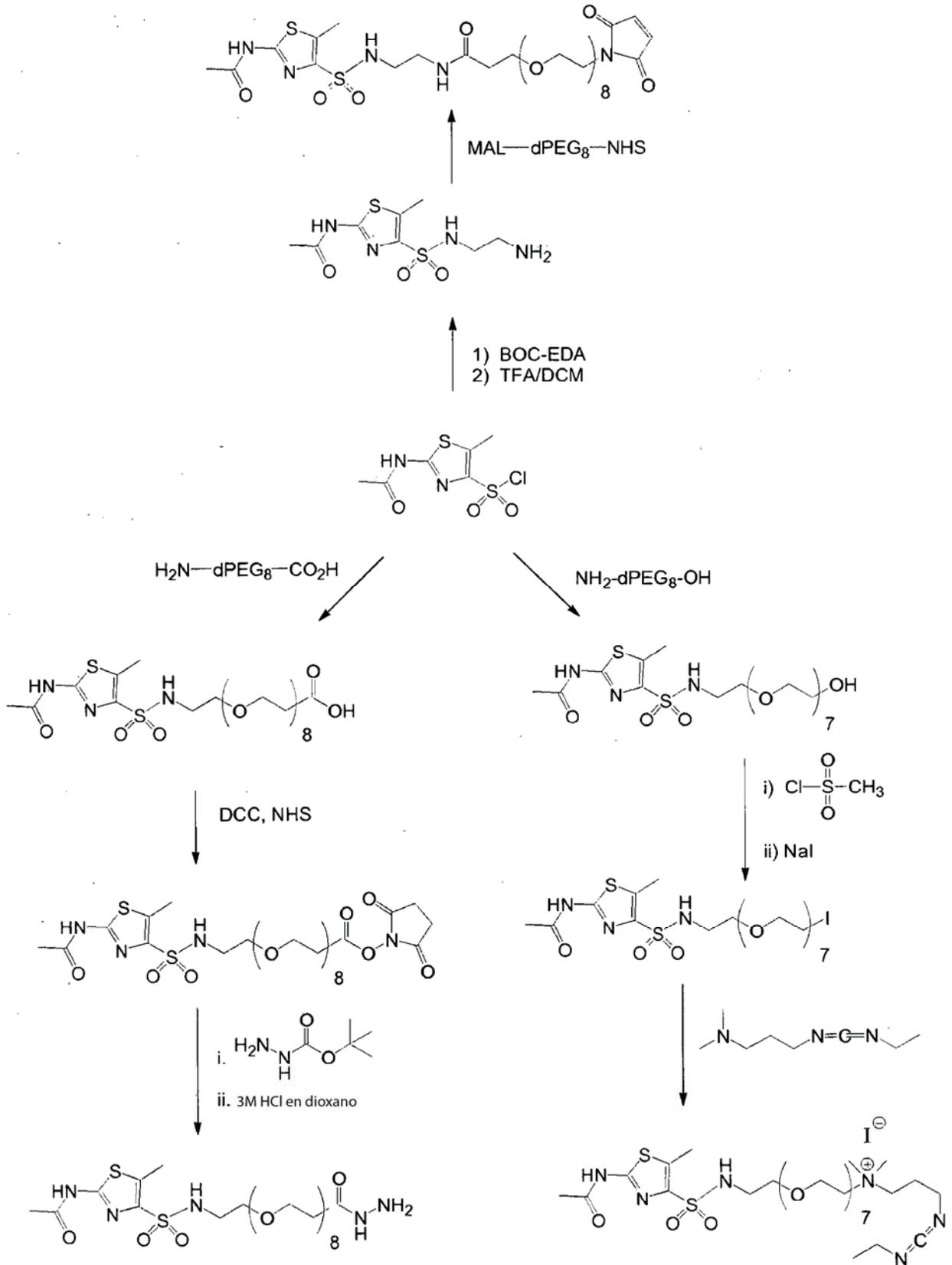
NHS se produjo utilizando N-3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDAC). Como primera opción, el éster de NHS se puede hacer reaccionar con una diamina para producir una amida que tiene una amina terminal. Este compuesto se puede hacer reaccionar después con un éster de maleimida-PEG-NHS para el acoplamiento al hapteno de un conector PEG que tiene un extremo reactivo.

- 5 Como segunda alternativa ilustrada por el Esquema 9, el éster de NHS está preparado para el acoplamiento a un conector, si se desea, como los ejemplos de conectores de óxido de alquileo bifuncionales, es decir conectores PEG. Estos ejemplos de conectores PEG disponen de varios grupos funcionales reactivos, como una amina y un grupo de ácido carboxílico o una amina y un grupo hidroxilo. Al hacer reaccionar el éster de NHS con un conector se proporciona un compuesto terminado en ácido carboxílico o un compuesto terminado en un grupo hidroxilo. El ácido carboxílico se puede convertir en un éster de NHS utilizando DCC como agente de acoplamiento. El éster de NHS se puede hacer reaccionar con el reactivo de hidrazina protegida ilustrado, seguido de la desprotección en ácido hidrocórico, para producir una amida amino-terminal

- 10 Alternativamente, el compuesto terminado en hidroxilo se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido de una reacción con un haluro, como yoduro, para proporcionar el compuesto de haluro sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con la carbodiimida de amina de dimetilo ilustrada para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

7. Conjugados basados en oxazol y tiazol

- 20 El Esquema 10 ilustra un método adecuado para el acoplamiento de ejemplos de haptenos basados en oxazol y tiazol a un ejemplo de conector de óxido de alquileo. El conjugado de conector-hapteno se puede derivatizar entonces como se desee o se puede acoplar directamente a una molécula vehículo de proteína para formar un inmunógeno.



Esquema 10

Con respecto al Esquema 10, el ejemplo de hapteno de tiazol, que tiene un grupo funcional de cloruro de sulfonilo reactivo, se hizo reaccionar con diamina de etileno o con un ejemplo de conector PEG8 bifuncional. Como primera

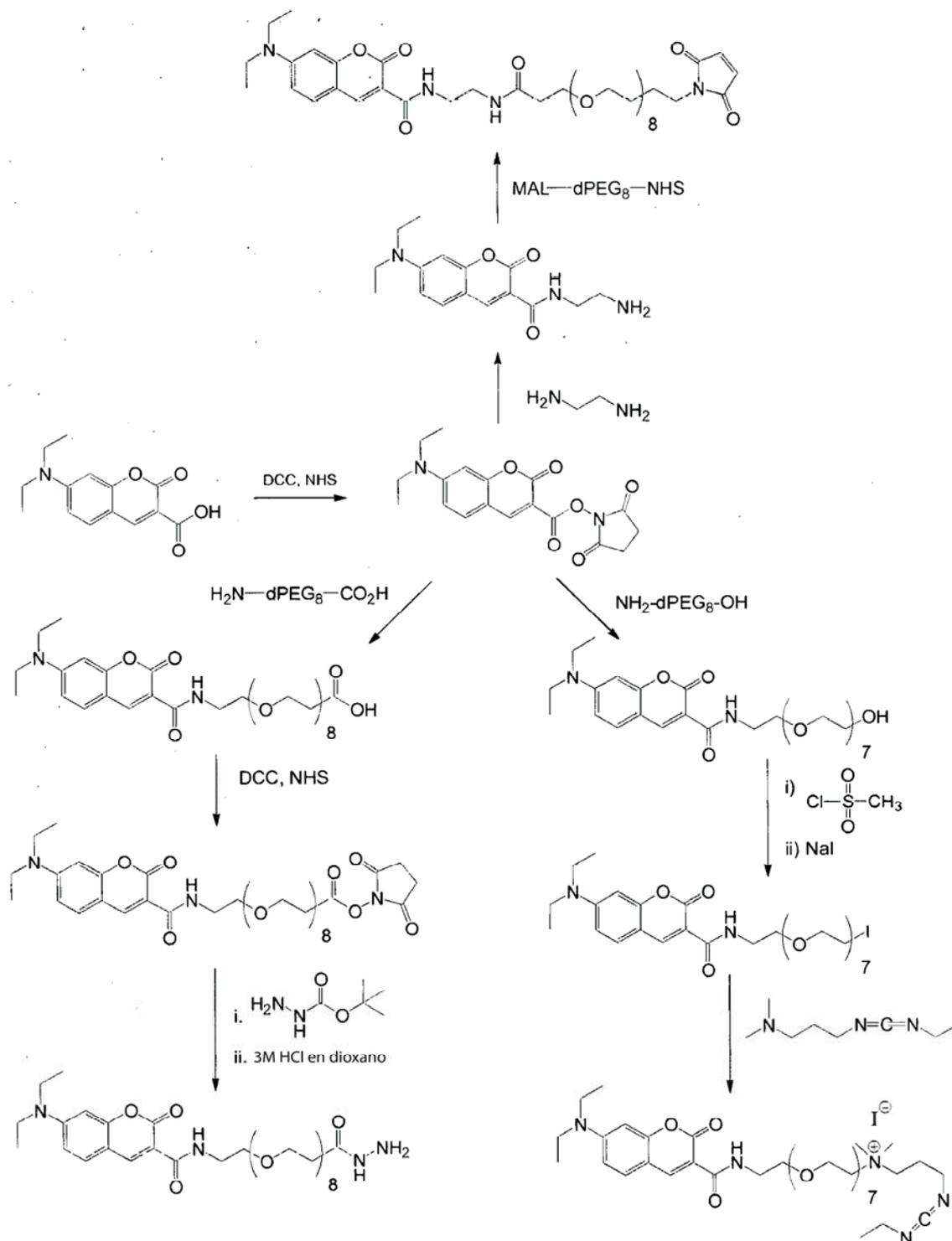
opción, el tiazol se puede hacer reaccionar con una diamina de etileno protegida por BOC, seguido de la desprotección con TFA, para producir una amida que tiene una amina terminal. Este compuesto se puede hacer reaccionar después con un éster de maleimida-PEG-NHS para acoplar un conector al hapteno. Alternativamente, el compuesto se puede acoplar directamente a una proteína vehículo para formar un inmunógeno.

5 Alternativamente, el hapteno de tiazol se puede hacer reaccionar con un conector amino-dPEG que tiene un grupo hidroxilo terminal o un grupo de ácido carboxílico terminal. El conector terminado en ácido carboxílico se puede convertir en el éster de NHS utilizando DCC, seguido de la reacción con una hidrazida protegida por BOC. El grupo BOC se puede retirar utilizando un ácido, como 3M HCl, para formar el conjugado terminado en hidrazida.

10 El conjugado PEG de sulfonamida de tiazol terminado en hidroxilo se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido de una reacción con un haluro, como yoduro, para proporcionar el compuesto de haluro sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con la carbodiimida de amina de dimetilo ilustrada para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

8. Conjugados de conector-hapteno basado en cumarina e inmunógenos

15 El Esquema 11 ilustra un método apropiado para acoplar ejemplos de haptenos basados en cumarina con un ejemplo de conector de óxido de alquileo. El conjugado de conector-hapteno resultante se puede continuar derivatizando como se desee o se puede acoplar a un vehículo, como un vehículo de proteína, para formar un inmunógeno.



Esquema 11

5 Con respecto al Esquema 11, el compuesto de partida incluye un grupo funcional de ácido carboxílico que se convirtió en un NHS utilizando DCC como agente de acoplamiento. Como primera opción, el éster de NHS se puede hacer reaccionar con diamina de etileno para producir una amida que tiene una amina terminal. Este compuesto se puede hacer reaccionar después con un éster de maleimida-PEG-NHS para acoplar el hapteno a un conector que tiene un grupo funcional terminal reactivo.

10 Alternativamente, el éster de NHS se puede acoplar con el ejemplo de PEG8 bifuncional para producir amidas que tienen un grupo funcional hidroxilo o ácido carboxílico terminal. El grupo funcional de ácido carboxílico se puede

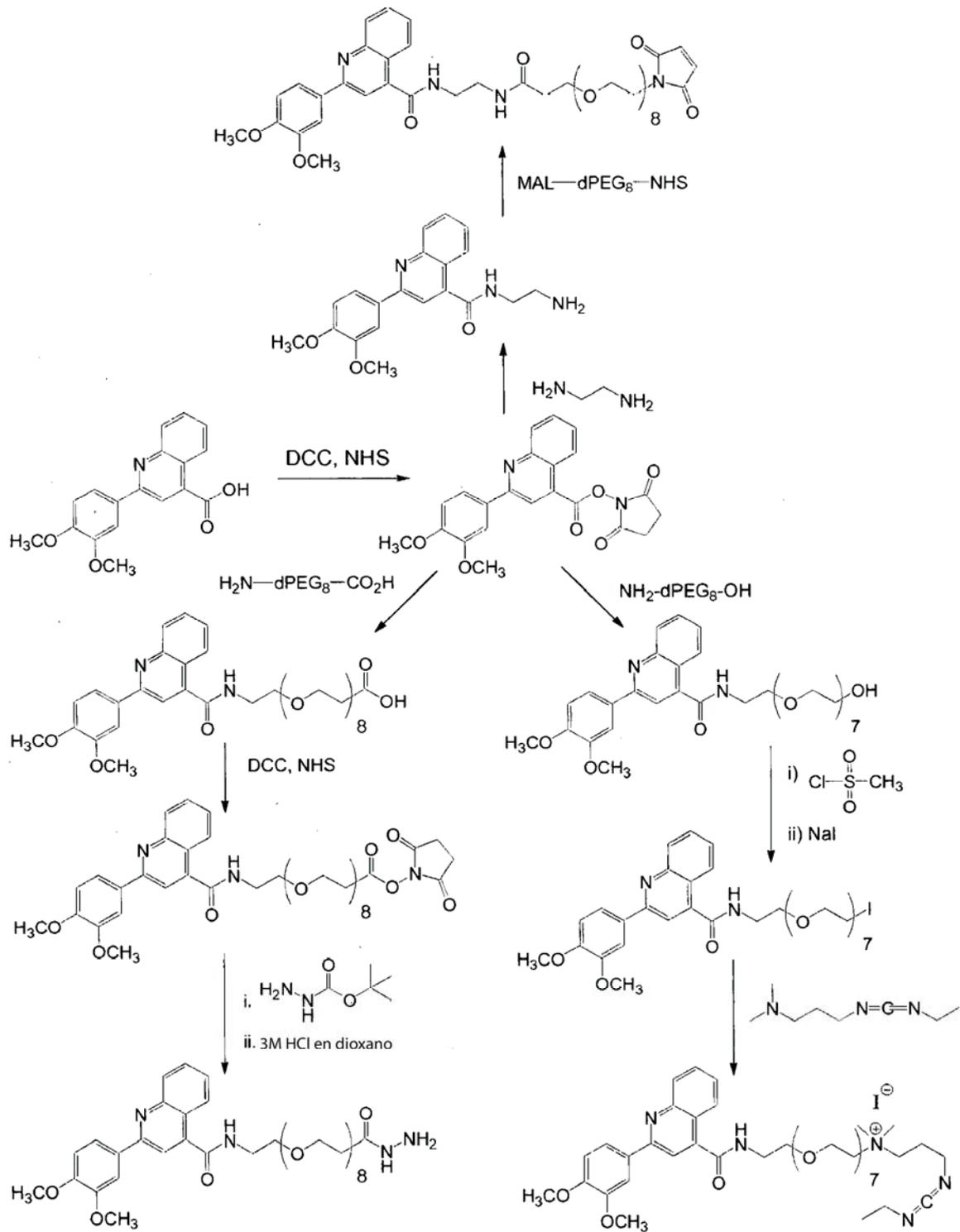
convertir en un éster de NHS utilizando DCC como agente de acoplamiento. El éster de NHS se hizo reaccionar entonces con el compuesto de hidrazina protegida, seguido por desprotección en el ácido hidroclicóricó 3M en dioxano, para producir la hidrazida. Alternativamente, el éster de NHS se puede acoplar con una proteína inmunogénica para producir un inmunógeno.

- 5 El conjugado PEG de cumarina terminado en hidroxilo se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido de la reacción con un haluro, como yoduro, para proporcionar el compuesto de haluro sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con la carbodiimida de amina de dimetilo ilustrada para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

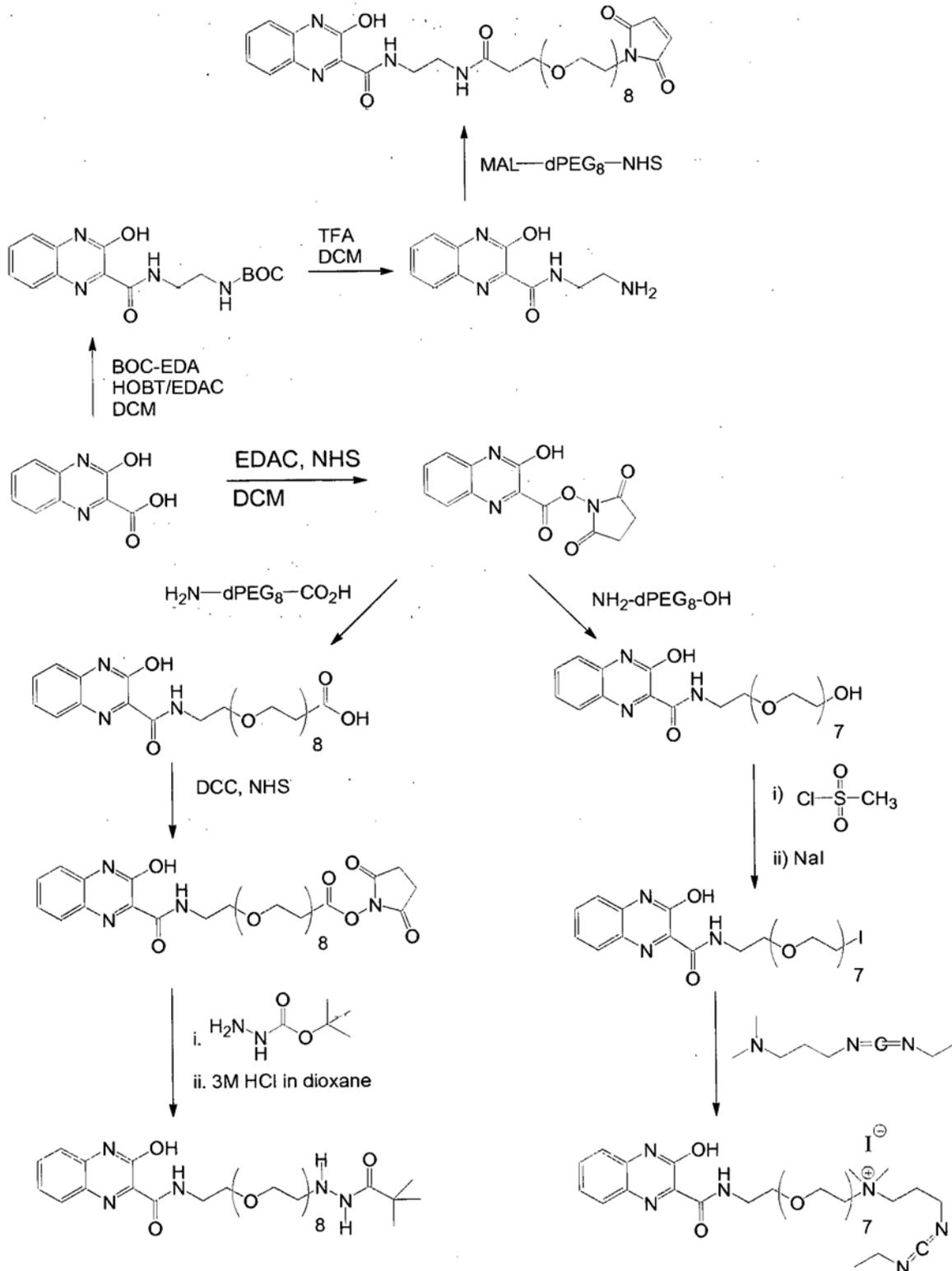
9. Conjugados de conector-ciclolignano e inmunógenos

- 10 El Esquema 12 ilustra un método apropiado para el acoplamiento de ejemplos de haptenos basados en podofilotoxina con un ejemplo de conector de óxido de alquileo. El conjugado de conector-hapteno se puede seguir derivatizando como se desee o unirse directamente a una molécula vehículo, como una molécula vehículo de proteína.

- mostrada), seguida por una reorganización del anillo hasta un heterociclo de 5 miembros, produciendo así un compuesto que tiene un grupo funcional de ácido carboxílico por abertura del anillo de la lactona. Este compuesto se convirtió al éster de NHS, utilizando DCC o EDAC. Como primera opción, el éster de NHS se puede hacer reaccionar con diamina de etileno para producir una amida que tiene una amina terminal. Este compuesto se puede hacer reaccionar después con un éster de maleimida-PEG-NHS para acoplar un conector al hapteno.
- 5
- Alternativamente, el éster de NHS se acopló con un conector PEG8 para producir una amida que tenía un grupo funcional hidroxilo o ácido carboxílico terminal. El grupo funcional carboxílico de la amida se convirtió en el éster de NHS. Este compuesto se acopló después a un vehículo de proteína para producir un inmunógeno. Alternativamente, el éster de NHS se hizo reaccionar con un reactivo de hidrazina protegida por BOC, seguido de desprotección en ácido hidroclicórico 3M en dioxano, para producir la hidrazida.
- 10
- El conjugado PEG terminado en hidroxilo se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido de una reacción con un haluro, como yoduro, para proporcionar el compuesto de haluro sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con la carbodiimida de amina de dimetilo ilustrada para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.
- 15
10. Conjugados de heteroarilo
- Los Esquemas 13 y 14 ilustran un método apropiado para el acoplamiento de ejemplos de haptenos basados en heteroarilo con un ejemplo de conector de óxido de alquileo. El conjugado de conector-hapteno se puede seguir derivatizando como se desee o unirse directamente a una molécula vehículo, como una molécula vehículo de proteína.



Esquema 13



uema 14

Esq

5 Con respecto a los Esquemas 13 y 14, los compuestos de partida incluyen cada uno de ellos un grupo funcional de ácido carboxílico. En un primer planteamiento, el ácido carboxílico se puede convertir en una etilamino amida mediante reacción con diamina de etileno protegida con BOC utilizando HOBT/EDAC. El grupo de protección BOC se elimina utilizando un ácido, como TFA en diclorometano. Este compuesto se puede hacer reaccionar entonces con un éster de maleimida-PEG-NHS para acoplar un conector al hapteno.

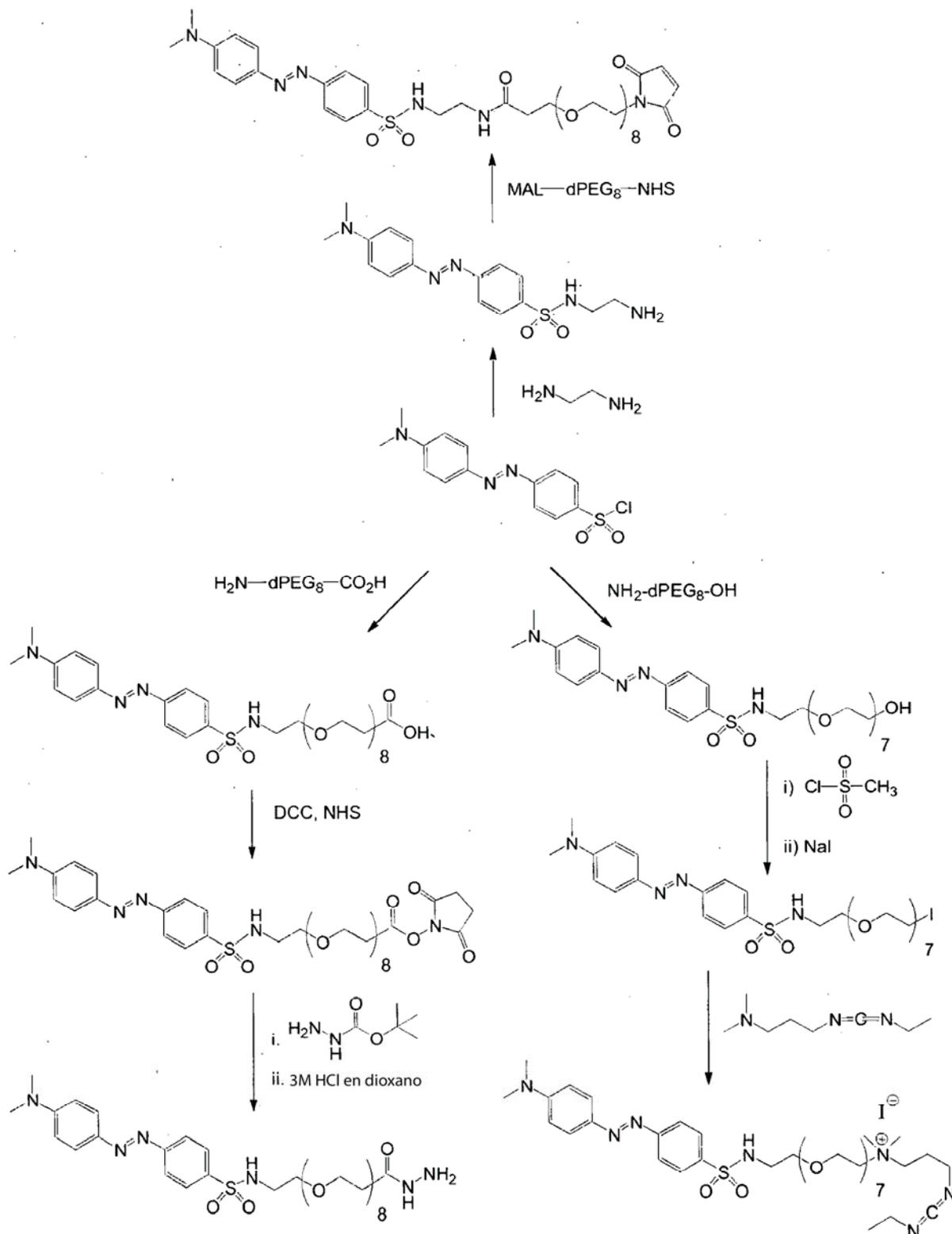
5 Alternativamente, el éster de NHS se puede acoplar con un conector de PEG₈ para producir una amida que tiene un ácido carboxílico terminal o un grupo funcional hidroxilo. El grupo funcional carboxílico de la amida se puede convertir en un éster de NHS utilizando DCC como agente de acoplamiento. El éster de NHS se hizo reaccionar con un reactivo de hidrazina protegido por BOC, seguido de la desprotección en ácido hidrocórico 3M en dioxano, para producir la hidrazida. Alternativamente, el éster de NHS se puede acoplar con un vehículo de proteína para producir un inmunógeno.

10 El conjugado PEG terminado en hidroxilo se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido de una reacción con un haluro, como yoduro, para proporcionar el compuesto de haluro sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar dimetilamina carbodiimida para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

11. Conjugados de azoarilo

El Esquema 15 ilustra un método adecuado para el acoplamiento de ejemplos de haptenos basados en azoarilo a un ejemplo de conector de óxido de alquileo. El conjugado de conector-hapteno se puede continuar derivatizando

como se desee o acoplarse directamente a una molécula vehículo, como una molécula vehículo de proteína.



Esquema 15

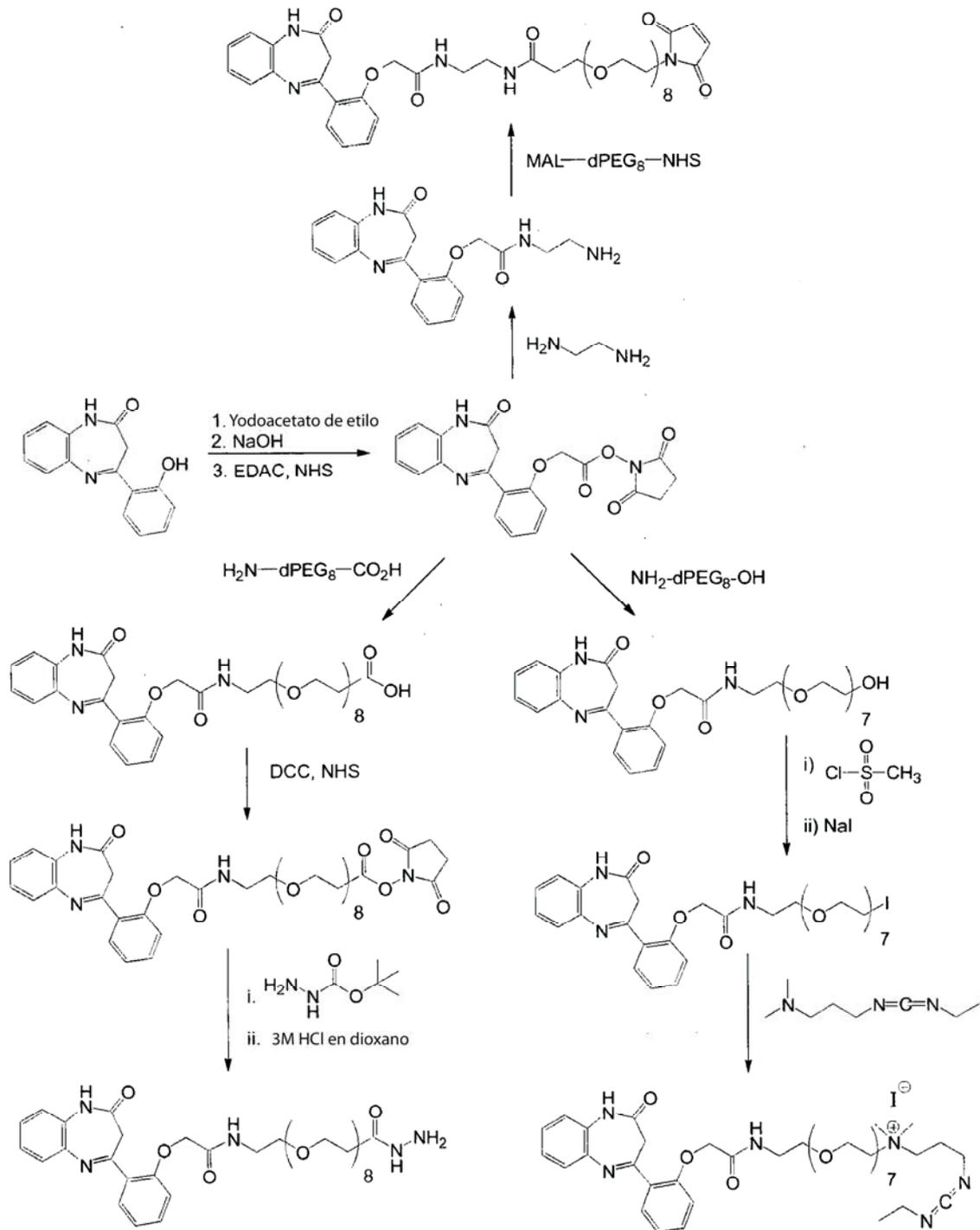
- 5 Con respecto al Esquema 15, el ejemplo de hapteno de azoarilo, que tiene un grupo funcional reactivo de cloruro de sulfonilo, se hizo reaccionar con diamina de etileno o con un ejemplo de conector de PEG₈ bifuncional. Como primera opción, el compuesto de azoarilo se puede hacer reaccionar con diamina de etileno para producir una sulfamida que presenta una amina terminal. Este compuesto se puede hacer reaccionar entonces con un éster de maleimida-PEG-NHS para acoplar al hapteno un conector que tiene un grupo funcional terminal reactivo.

5 Alternativamente, el cloruro de sulfonilo reactivo se puede hacer reaccionar con un conector de PEG₈ para producir una sulfamida que tiene un grupo funcional hidroxilo o ácido carboxílico terminal. El grupo funcional carboxílico de la amida se puede convertir en un éster de NHS utilizando DCC como agente de acoplamiento. El éster de NHS se hizo reaccionar con un reactivo de hidrazina protegido por BOC, seguido de la desprotección en ácido hidroclicórico 3M en dioxano, para producir la hidrazida. Alternativamente, el éster de NHS se puede acoplar con un vehículo de proteína para producir un inmunógeno.

10 El conjugado PEG terminado en hidroxilo se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido de una reacción con un haluro, como yoduro, para proporcionar el compuesto de haluro sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar dimetilamina carbodiimida para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

12. Conjugados de benzodiazepina

15 El Esquema 16 ilustra un método adecuado para el acoplamiento de ejemplos de haptenos basados en benzodiazepina con un ejemplo de conector de óxido de alquileo. El conjugado de conector-hapteno se puede continuar derivatizando como se desee o acoplarse directamente a una molécula vehículo, como una molécula vehículo de proteína.



Esquema 16

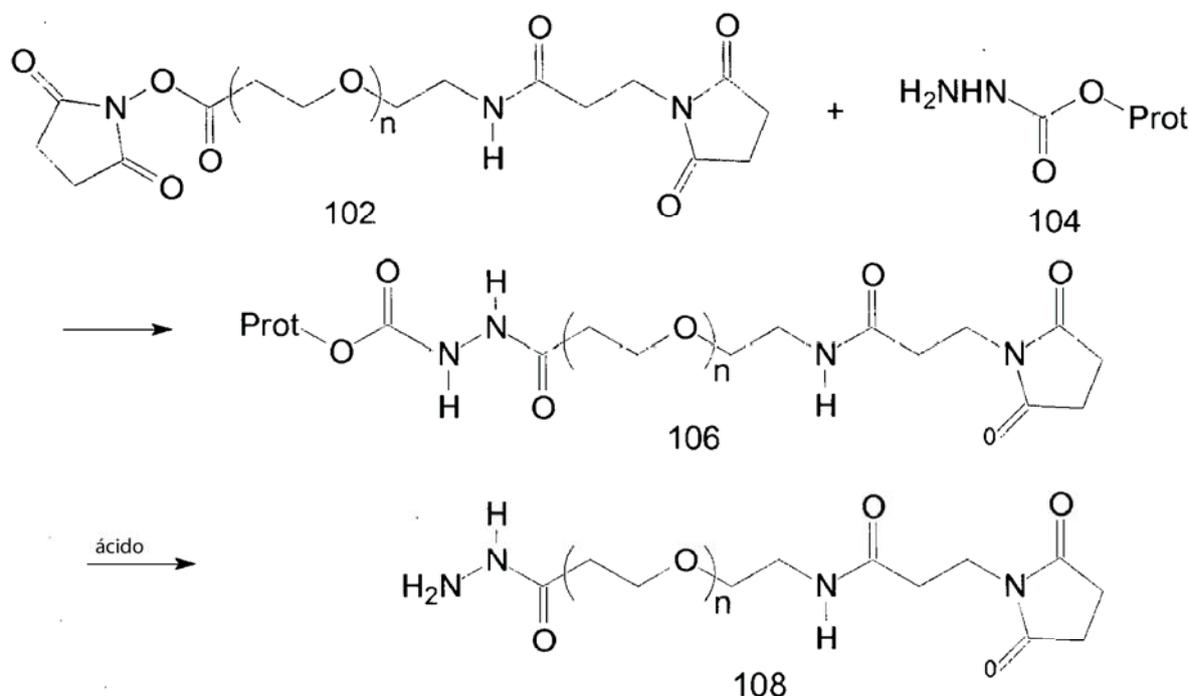
- 5 Con respecto al Esquema 16, el ejemplo de hapteno de benzodiazepina incluye un grupo hidroxilo. Este grupo se hizo reaccionar con yodoacetato de etilo, seguido de un tratamiento con hidróxido de sodio para producir un compuesto con un grupo funcional de ácido carboxílico terminal. El ácido carboxílico se convirtió en un éster de NHS utilizando EDAC como agente de acoplamiento. El éster de NHS se hizo reaccionar con diamina de etileno o con un ejemplo de conector de PEG₈ bifuncional. Como primera opción, el compuesto de azoarilo se puede hacer reaccionar con diamina de etileno para producir una amida que tiene una amina terminal. Este compuesto se puede hacer reaccionar entonces con un éster de maleimida-PEG-NHS para acoplar un conector al hapteno.
- 10

Alternativamente, el éster de NHS reactivo se puede hacer reaccionar con un conector de PEG₈ para producir una amida que tiene un grupo funcional hidroxilo o ácido carboxílico terminal. El grupo funcional carboxílico de la amida se puede convertir en un éster de NHS utilizando DCC como agente de acoplamiento. El éster de NHS se hizo reaccionar con un reactivo de hidrazina protegido por BOC, seguido de la desprotección en ácido hidroclicórico 3M en dioxano, para producir la hidrazida. Alternativamente, el éster de NHS se puede acoplar con un vehículo de proteína para producir un inmunógeno.

El conjugado PEG terminado en hidroxilo se puede hacer reaccionar con cloruro de mesilo, seguido de una reacción con un haluro, como yoduro, para proporcionar el compuesto de haluro sustituido. Este compuesto se puede hacer reaccionar con dimetilamina carbodiimida para producir un compuesto útil para el etiquetado directo de una biomolécula.

13. Síntesis del conector de PEG de maleimida/hidrazida

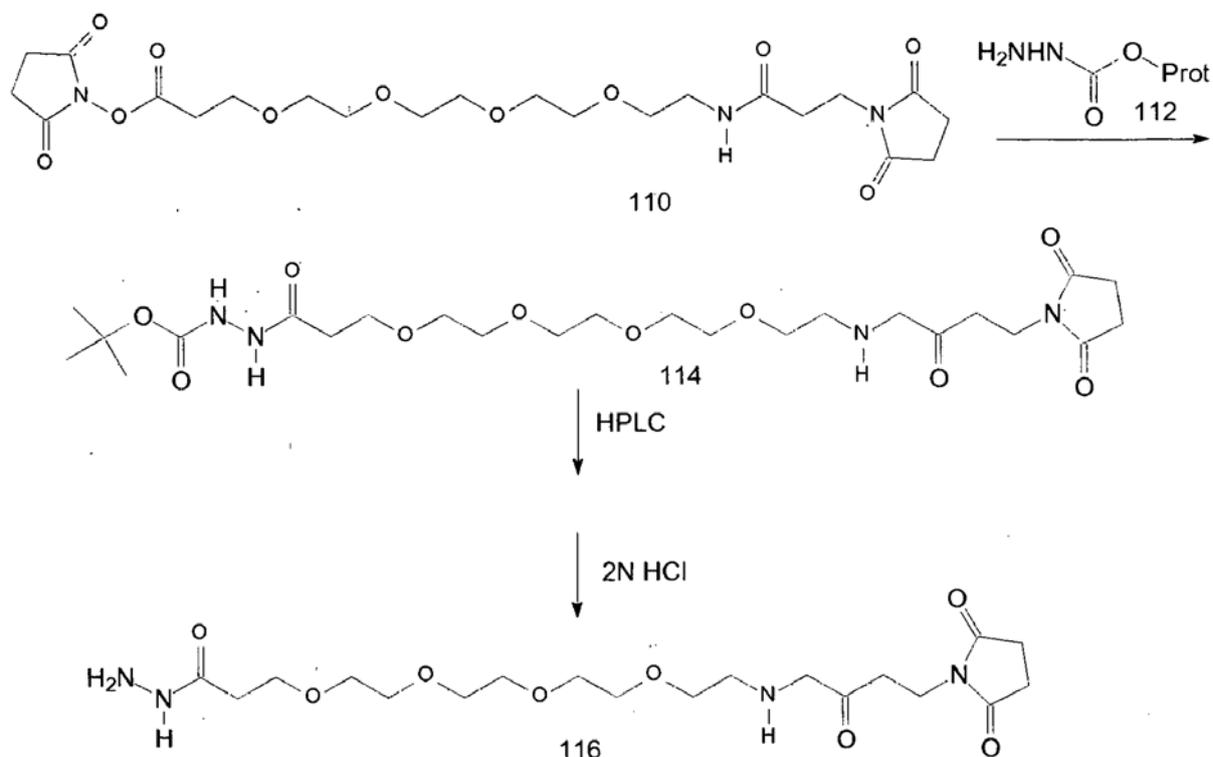
El Esquema 17 muestra un método general para preparar conectores de PEG heterobifuncionales de maleimida/hidrazida. Dicho brevemente, el conector de PEG 102 del éster activo/maleimida (como el obtenido de Quanta Bioscience) se hace reaccionar con un derivado de hidrazina protegido 104 para producir el compuesto 106. El compuesto 106 se desprotege después con ácido para obtener el conector de PEG de maleimida/hidrazida 108.



Esquema 17

Una síntesis específica de un conector de PEG₄ de maleimida/hidrazida se presenta en el Esquema 16 más abajo. Al éster activo 110 (116mg, 1,0 eq.) en 5 ml de dioxano seco se añadieron 30 mg (1,0 eq.) de la hidrazina protegida por BOC 112 en 5 ml de dioxano seco durante 1 hora. La reacción se agitó entonces a temperatura ambiente bajo nitrógeno seco durante 16 horas. La mezcla de la reacción se fraccionó mediante HPLC utilizando un Waters Delta 600 HPLC equipado con detector de luz con fotodiodo 2996 y una columna Phenomenex Luna 1010 μ , C18(2), 100A, 250 x 30 mm. La columna se sometió a elución con ACN/agua al 30-60% durante 30 minutos a una velocidad de flujo de 12 ml / min. La maleimida-PEG₄ 114 protegida por BOC deseada se eluyó a los 38 minutos, dando 50 mg de un aceite amarillo espeso tras secado en condiciones de alto vacío. La hidrazina desprotegida final 116 se obtuvo a continuación, agitando el residuo con 6 ml de 2N HCL/dioxano anhidro bajo nitrógeno seco durante 45 minutos. La concentración mediante evaporación rotatoria produjo entonces 55 mg de la sal de HCL de hidrazida-PEG₄.

maleimida.



Esquema 18

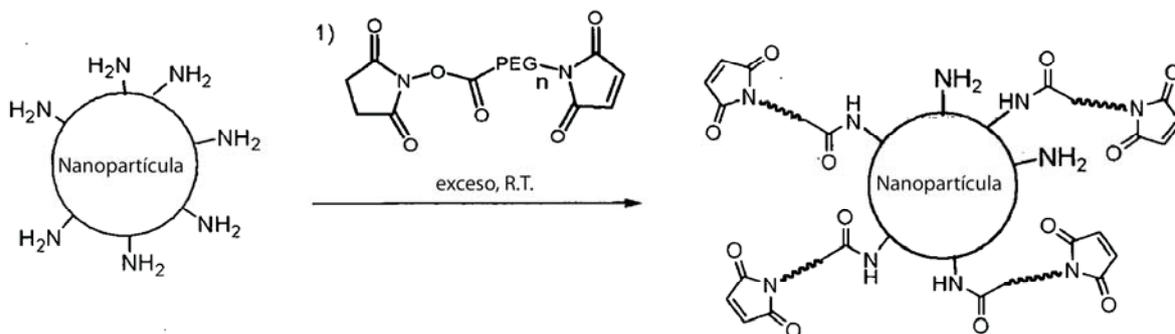
5 14. Conjugados de etiqueta detectable-conector

Determinadas realizaciones de la presente divulgación se refieren a la formación de conjugados utilizando conectores. Los siguientes ejemplos de carácter no limitador se proporcionan para ilustrar las realizaciones del método por referencia a las realizaciones para la formación de conjugados de etiqueta detectable utilizando ésteres activos de PEG de maleimida para ejemplificar el proceso. Un experto en la técnica apreciará que las realizaciones ilustradas se pueden utilizar para formar otros tipos de conjugados divulgados en el presente.

10

En una realización, un conjugado de una nanopartícula de una fracción de unión específica divulgado se prepara de acuerdo con los procesos descritos en los Esquemas 19 a 22 más abajo, donde el conector de glicol de polialquileno heterobifuncional es un conector de glicol de polietileno que tiene un grupo reactivo de amina (éster activo) y un grupo reactivo de tior (maleimida). Como se muestra en el Esquema 19, una nanopartícula (como un quantum dot) que tiene uno o más grupos amina disponibles se hace reaccionar con un sobrante del conector para formar una nanopartícula activada.

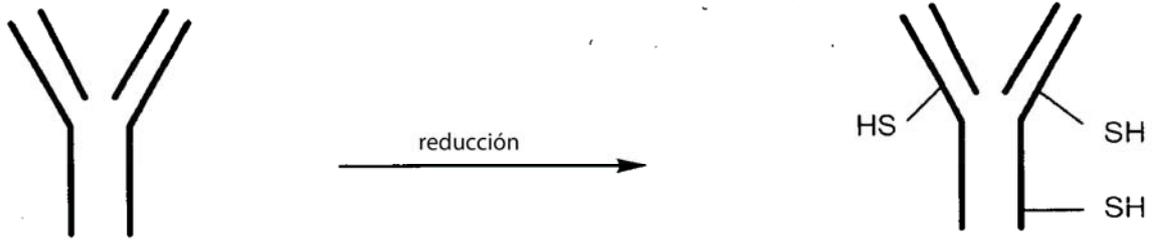
15



Esquema 19

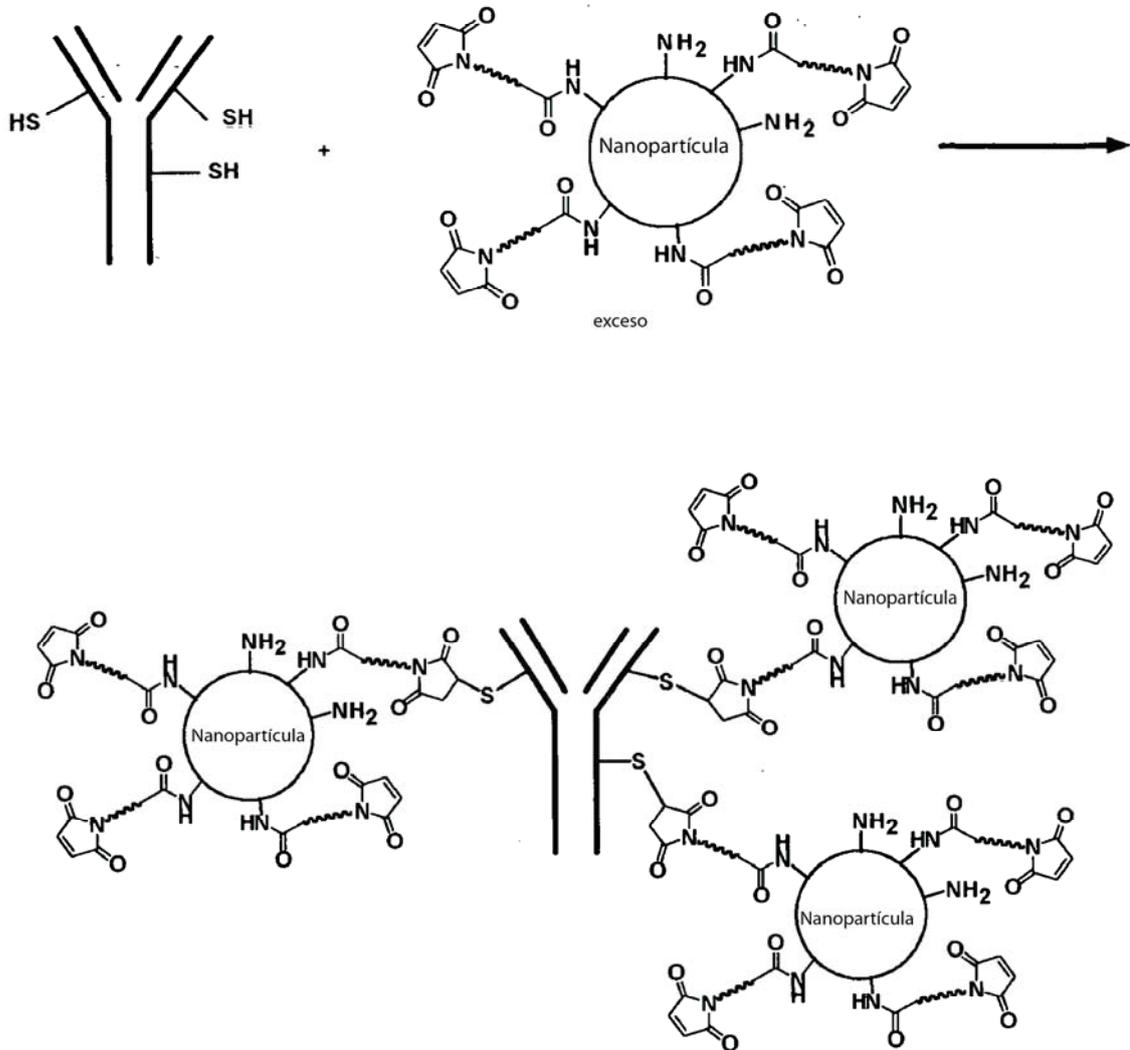
5 Los grupos de tior se pueden introducir en el anticuerpo tratando este último con un agente reductor como DTT, tal como se muestra en el Esquema 20. Para un agente reductor suave, como DTE o DTT, se utiliza una concentración de entre 1 mM y 40 mM aproximadamente, por ejemplo, una concentración de entre 5 mM y 30 mM aproximadamente, y más típicamente de entre 15 mM y 25 mM aproximadamente, para introducir un número limitado de tioles (como entre 2 y 6 aproximadamente) en el anticuerpo, al tiempo que se mantiene intacto este último (lo que se puede determinar mediante cromatografía de exclusión por tamaño). La cantidad apropiada de tiempo para la reacción con una solución de una concentración concreta se puede determinar fácilmente mediante titulación del número de tioles producidos en una cantidad de tiempo determinada, aunque típicamente se deja que la reacción se produzca entre 10 minutos y un día aproximadamente, por ejemplo entre 15 minutos y 2 horas

10 aproximadamente, por ejemplo entre 20 minutos y 60 minutos aproximadamente.



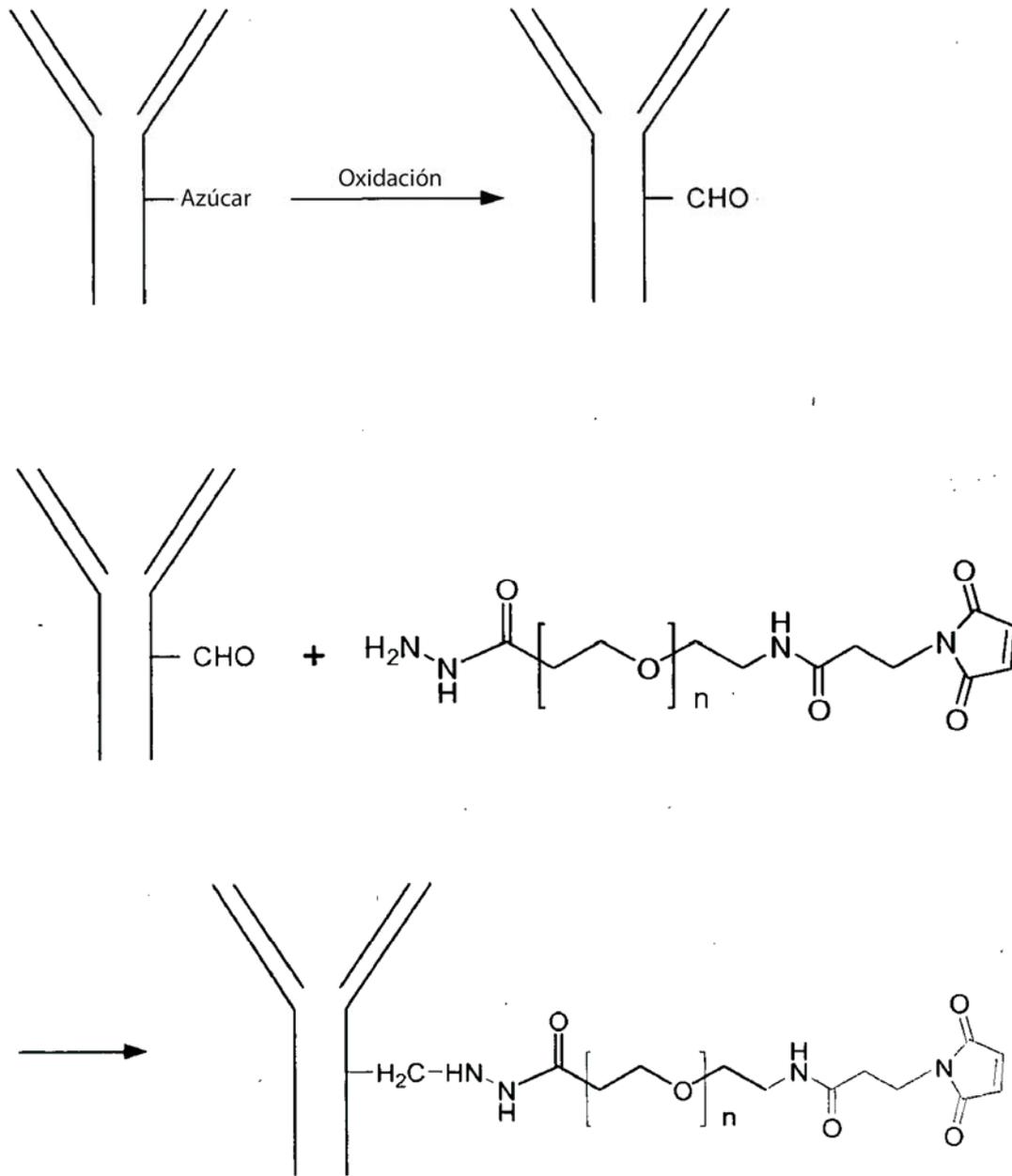
Esquema 20

Los componentes producidos de conformidad con los Esquemas 19 y 20 se combinan a continuación para proporcionar un conjugado como el mostrado en el Esquema 21.



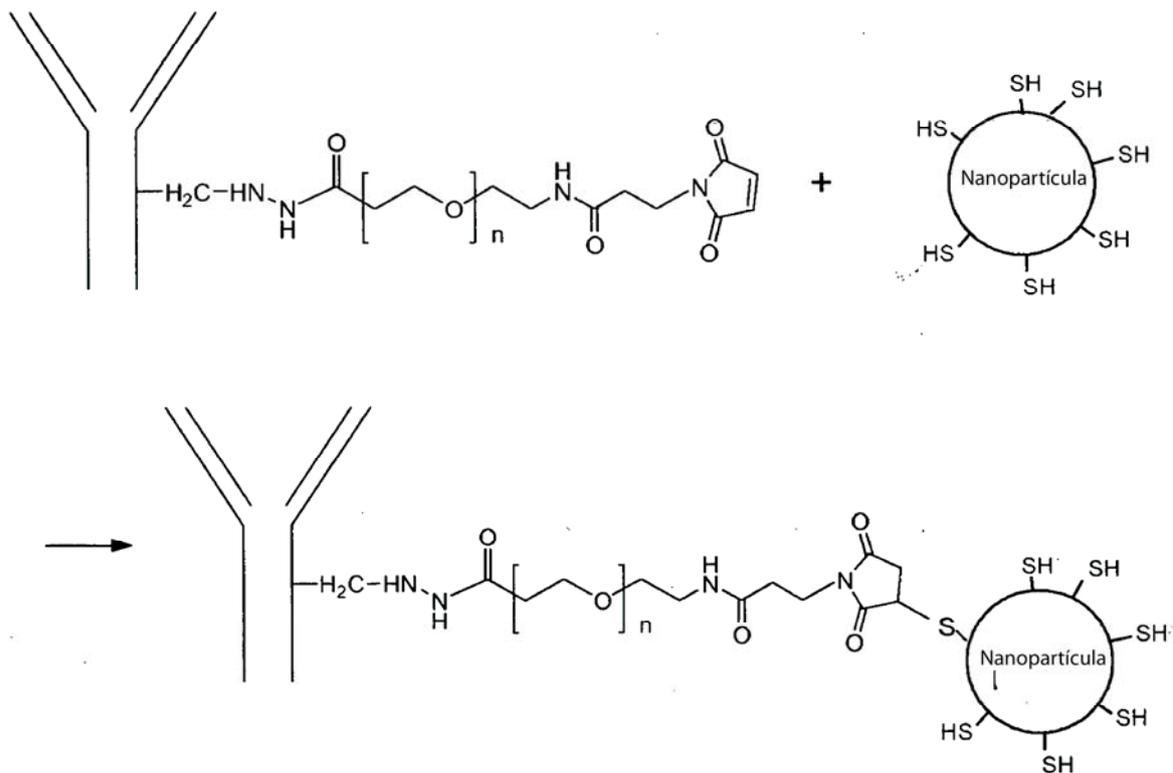
Esquema 21

- 5 A pesar de que los Esquemas 19-21 ilustran un proceso óptimo para los ésteres activos de PEG de maleimida, donde la nanopartícula se activa primero haciendo reaccionar un grupo o grupos amina con el éster activo del conector para formar una nanopartícula activada, también resulta posible activar primero el anticuerpo haciendo reaccionar una amina o aminas o un tiol o tioles del anticuerpo con el conector y, a continuación, hacer reaccionar el anticuerpo activado con la nanopartícula (que tiene un tiol o tioles o una amina o aminas para reaccionar con el grupo reactivo restante del conector, según corresponda).
- 10 De este modo, en una realización alternativa, se activa un anticuerpo para la conjugación y, a continuación, se conjuga con una nanopartícula como se muestra en los Esquemas 22 y 23 más abajo. En el Esquema 23, se activa el anticuerpo en lugar de la nanopartícula, como se mostró en el Esquema 19. En la realización concreta del Esquema 22, una fracción de azúcar (como la ubicada en una región glicosilada de la porción Fc del anticuerpo) se oxida primero para proporcionar un grupo aldehído, que posteriormente se hace reaccionar con un grupo reactivo de
- 15 aldehído del conector (como un grupo hidrazida del conector de PEG de maleimida/hidrazida ilustrado).



Esquema 22

- 5 A continuación, tal como se muestra en el Esquema 23, un grupo reactivo de tiol de la porción del conector del anticuerpo activado (como el grupo maleimida ilustrado) se hace reaccionar con un grupo tiol de la nanopartícula. Una vez más, el proceso se puede invertir, haciendo reaccionar primero el conector con un grupo aldehído de la nanopartícula (formado, por ejemplo, mediante oxidación de la fracción de azúcar) para formar una nanopartícula activada y, a continuación, se puede hacer reaccionar la nanopartícula activada con un grupo tiol del anticuerpo.



Esquema 23

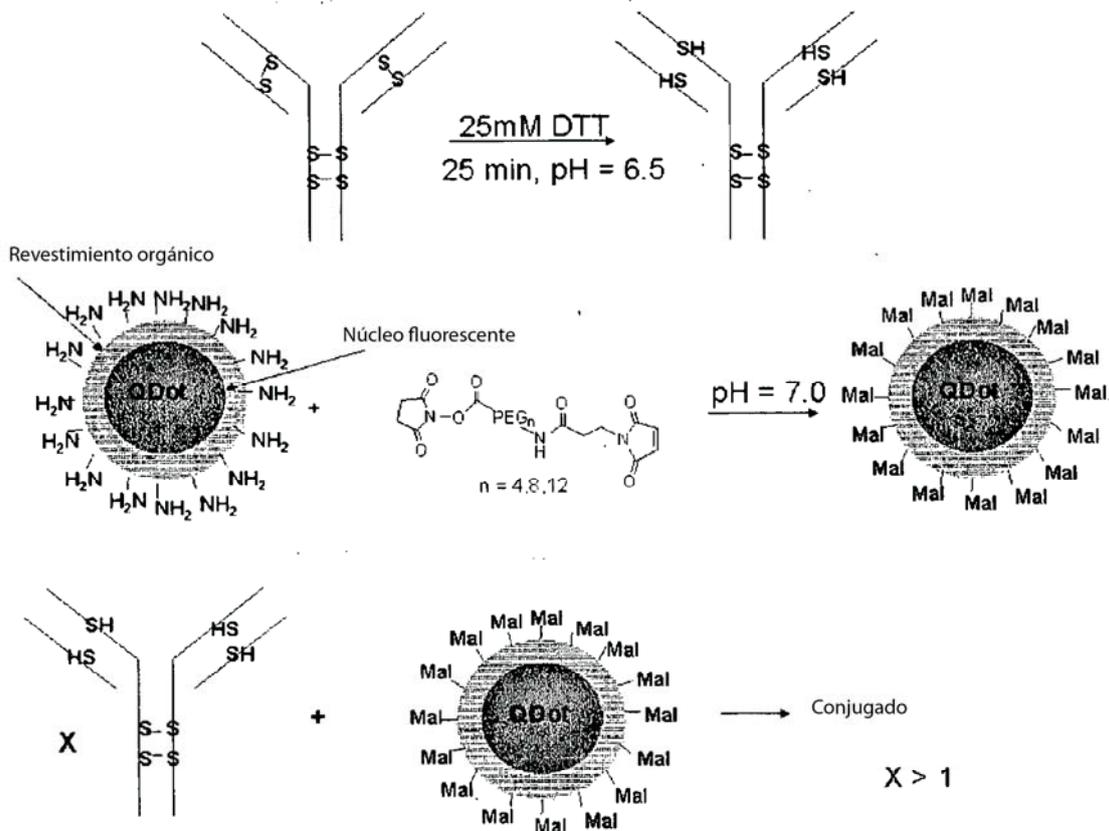
A pesar de que los Esquemas 17-2 y 22 del presente muestran ejemplos concretos de conjugados con fines ilustrativos, se entenderá que el ratio de fracción de unión específica (en este caso, del anticuerpo) respecto de la nanopartícula en los conjugados divulgados puede variar entre múltiples (como 5, 10, 20 o más) fracciones de unión específica por nanopartícula y múltiples nanopartículas por fracción de unión específica (como 5, 10, 20 o más).

15. Introducción de tioles en anticuerpos

Para activar un anticuerpo para la conjugación, por ejemplo, un anticuerpo anti IgG de ratón o anti IgG de conejo, el anticuerpo se puede incubar con 25 mmol de DTT a temperatura ambiente (23 - 25 °C) durante unos 25 minutos. Tras la purificación en una columna PD-10 SE, se obtiene el anticuerpo libre de DTT, típicamente con dos a seis tioles libres (Esquema 2). Por lo general, el ejemplo de procedimiento descrito para la preparación el tiol de IgG de cabra anti-ratón es aplicable a otros anticuerpos. El número de tioles por anticuerpo se puede determinar mediante titulación, por ejemplo, utilizando el ensayo de tiol descrito en la Solicitud de patente provisional estadounidense nº 60/675759, presentada el 28 de abril de 2005, que queda incorporada al presente por referencia.

16. Conjugados de inmunoglobulinas y estreptavidina con quantum dots de CdSe/ZnS para la detección por hibridación in situ e inmunohistoquímica (y multiplexada) ultrasensible en muestras de tejido.

En este ejemplo se describe una realización de un método para incorporar una inmunoglobulina a la superficie de un quantum dot. Esta realización implica: 1) funcionalización de los grupos de recubrimiento del quantum dot terminados en amina con el correspondiente éster de NHS heterobifuncional -(PEG) x -maleimida ($x= 4, 8, 12$); 2) reducción de disulfuros nativos mediante tratamiento con ditioneitol (DTT); 3) derivatización de quantum dots terminados en maleimida con estas inmunoglobulinas tioladas; y 4) purificación de los conjugados utilizando técnicas adecuadas; como una cromatografía de exclusión por tamaño. El proceso se ilustra en el Esquema 24.



Esquema 24

5 Se puede producir un conjugado de estreptavidina sustituyendo una estreptavidina tiolada por la inmunoglobulina tiolada. Por ejemplo, una molécula de estreptavidina tratada con 2-iminotiolano.

10 Los quantum dots utilizados en este ejemplo se protegieron con un revestimiento unido electrostáticamente de óxido de trietilfosfina (TOPO) y un polímero anfifílico intercalado para inducir la solubilidad en agua. Este polímero tiene aproximadamente 30 grupos amina terminales para una mayor funcionalización. Véase E.W. Williams, et. al. "Surface-Modified Semiconductive and Metallic Nanoparticles Having Enhanced Dispersibility in Aqueous Media", Patente estadounidense nº 6.649.138 (incorporada al presente por referencia). Con el fin de formar conjugados de quantum dot altamente sensibles, se les añadieron anticuerpos en diversas proporciones. La química es similar a la descrita en la Solicitud de patente provisional estadounidense nº 60/675759, presentada el 28 de abril de 2005, que se incorpora al presente por referencia.

15 Esta metodología resulta beneficiosa al precisarse pocos reactivos debido al uso de disulfuros nativos. Por otra parte, el anticuerpo permanece separado y no forma fragmentos. Esto se traduce en dos sitios de unión en cada anticuerpo unido. Por otra parte, se producen conjugados altamente estables y brillantes. El brillo es superior al de los conjugados de quantum dot-estreptavidina disponibles en el mercado (Invitrogen Corporation, Eugene, OR) sobre el mismo tejido. Se produjeron anticuerpos de cabra anti-biotina y de conejo anti-DNP con quantum dots de diferentes longitudes de onda de emisión, permitiendo así ensayos multiplexados. La detección de HPV mediante FISH se demostró con los conjugados de quantum dot divulgados.

VIII. Realizaciones de un método para el uso de haptenos, conjugados de hapteno y composiciones de los mismos divulgados

25 A. Hibridación in situ

30 En el presente se divulgan determinados ejemplos de realizaciones de la presente divulgación con respecto a las ilustraciones adjuntas. La Fig. 1 ilustra una realización de una hibridación in situ del Esquema 10 que se puede implementar con diversas realizaciones de haptenos divulgadas. Se selecciona una muestra que tiene una diana 12, como una proteína. Se selecciona también una sonda 14 útil para detectar la diana 12, como un anticuerpo. Se conjuga al menos un hapteno 16 de las clases de haptenos divulgadas en el presente con la sonda 14. La diana 12 es tratada con la sonda 14 conjugada con el hapteno 16 de manera efectiva para formar un complejo que se pueda visualizar utilizando cualquier medio adecuado. La Fig. 1 ilustra el tratamiento de la diana 12 unida al conjugado de

sonda-hapteno con un anticuerpo anti-hapteno 18 que tiene una etiqueta detectable 20. Un experto en la técnica apreciará que la etiqueta detectable 20 puede ser cualquier variedad de fracción generadora de señales divulgada en el presente o conocida por un experto en la técnica, o combinaciones de las mismas, tales como una enzima, un cromóforo orgánico, como un fluoróforo, nanopartículas cromofóricas, como quantum dots fluorescentes, etc. La etiqueta detectable 20 se utiliza para visualizar el complejo. Por ejemplo, si la etiqueta detectable 20 es una enzima, se proporciona un sustrato para la enzima, produciendo así un precipitado exclusivamente identificable, como un precipitado coloreado.

La Fig. 1 ilustra asimismo el uso de al menos una sonda y típicamente varias sondas, donde esta sonda o sondas se conjugan al menos con un hapteno y potencialmente con varios haptenos diferentes para visualizar de forma simultánea varias dianas en una muestra. La Fig. 1 ilustra una muestra que tiene una diana concreta 22 que es reconocida por una sonda 24. El hapteno 26 se conjuga con la sonda 24. El hapteno 26 puede ser igual que el hapteno 16 o diferente. La muestra se trata entonces con un anticuerpo anti-hapteno 28 conjugado con una etiqueta detectable 30. Este proceso puede continuar, tal como se ilustra para las dianas 32 y 42.

Las fracciones generadoras de señales 20, 30, 40 y 50 ilustradas en la Fig. 1 pueden ser la misma etiqueta, como una enzima. En esta situación, el proceso puede comprender la adición de anticuerpos anti-hapteno 18, 28, 38 y 40 secuencialmente. Después de cada aplicación se forma un precipitado diferente, añadiendo un sustrato diferente. Los sustratos utilizados para reacciones de visualización anteriores se lavan de las muestras antes de añadir los segundos sustratos y los posteriores.

La Fig. 2 ilustra un anticuerpo 60 acoplado a una etiqueta detectable, como una enzima 62. Se añade el sustrato de una enzima 64 para producir un producto enzimático detectable 66. Una realización específica de este proceso es la hibridación in situ con tinción de plata (SISH). Una enzima adecuada 62 para la SISH es la peroxidasa de rábano, utilizando iones de plata y peróxido de hidrógeno como sustrato. El producto detectable 66 son partículas de plata elemental.

En otro ejemplo, la enzima 62 puede ser fosfatasa alcalina. El sustrato 64 es una fuente de iones de plata y un reductante protegido con fosfato. Una vez más, el producto visualmente detectable 66 es plata elemental. La plata se puede detectar a través de cualquier medio apropiado, incluyendo la microscopía de campo claro.

La realización mostrada en la Fig. 2 también se puede utilizar para implementar una hibridación in situ cromogénica. En este proceso, se selecciona una enzima 62 de nuevo, cuyos ejemplos correspondientes incluyen los divulgados en el presente o los conocidos por un experto en la técnica, utilizando peroxidasa de rábano y fosfatasa alcalina para ejemplificar realizaciones concretas. A continuación se selecciona un sustrato adecuado para producir un producto precipitado coloreado 66 que se pueda detectar utilizando métodos conocidos en la técnica, incluyendo la microscopía de campo claro. El compuesto cromogénico puede ser fluorogénico. Los compuestos fluorogénicos adecuados son comercializados por diversas fuentes. Por ejemplo, Invitrogen Detection comercializa sustratos de beta-lactamasa y beta-lactamasa fluorogénica. El sustrato puede hacerse fluorogénico mediante acción enzimática o se puede dejar que el sustrato fluorogénico no sea fluorescente. También se pueden emplear quantum dots para visualizar interacciones inmunohistoquímicas. Las sondas fluorescentes y quantum dots típicamente se controlan utilizando un microscopio de fluorescencia.

La Fig. 3 ilustra una realización de un proceso de detección directo. Para este proceso se selecciona un anticuerpo primario 70 para una diana concreta. Por ejemplo, el anticuerpo primario 70 puede ser un anticuerpo monoclonal, como un anticuerpo de IgG monoclonal de ratón. El anticuerpo primario 70 también incluye típicamente una etiqueta detectable 72, tal como se ha debatido anteriormente.

Alternativamente, puede utilizarse un proceso de amplificación, tal como se ilustra esquemáticamente en la Fig. 4. Esta realización también se puede utilizar para pruebas de diagnóstico. Se selecciona una diana. Se añade el anticuerpo primario 80 a una muestra, de forma que se permita la formación de un complejo de la diana con el anticuerpo primario. Se añade un anticuerpo secundario 82 contra el anticuerpo primario 80 a la muestra. El anticuerpo 82 incluye una etiqueta detectable que se puede utilizar para identificar, concretamente de forma visual o mediante cualquier medio visual, como la microscopía, el complejo de la diana utilizando un sustrato, tal como se indica en el presente. El anticuerpo 82 puede ser cualquier anticuerpo adecuado, incluyendo, a modo de ejemplo y sin carácter limitador, un anticuerpo IgG de conejo anti-ratón etiquetado. Por otra parte, también se puede añadir un anticuerpo secundario 86 del anticuerpo primario 80 a la muestra. El anticuerpo 86 puede ser cualquier anticuerpo adecuado contra el anticuerpo primario, como un anticuerpo de una especie diferente. Por ejemplo, el anticuerpo 86 puede ser, a modo de ejemplo y sin carácter limitador, un anticuerpo de cabra activado contra el anticuerpo primario, como anticuerpos de IgG de ratón. La Fig. 4 ilustra la adición a la muestra de al menos un anticuerpo adicional 88 que tiene una etiqueta detectable 90, para amplificar la señal producida por la diana detectada. En este proceso de ejemplo, el anticuerpo 88 podría ser un anticuerpo de IgG de conejo anti-cabra. El anticuerpo 88 se puede añadir de forma simultánea al anticuerpo etiquetado 84 o con posterioridad.

Determinadas realizaciones de la presente divulgación se facilitan utilizando anticuerpos monoclonales anti-hapteno. La Fig. 5 representa esquemáticamente una realización de la presente invención útil para la detección de hibridoma. Como en el caso de los ejemplos precedentes, se selecciona una diana concreta. Por ejemplo, se identifica una diana situada en un tejido 100, como el epítipo lambda 102 ilustrado. Se administra un anticuerpo primario 104 dirigido a la diana 102 de una manera efectiva para que el anticuerpo reconozca la diana. Un ejemplo de un

anticuerpo primario adecuado 104 para el sistema ilustrado es el anticuerpo anti-lambda de conejo. Tal y como se ilustra en la Fig. 5, el anticuerpo 104 tiene al menos un hapteno y potencialmente varios haptenos 106 conjugados, como en el caso de la realización ilustrada. Un experto en la técnica reconocerá primero que el número de haptenos conjugados con el anticuerpo puede variar, aunque este número es típicamente entre 1 y 5 haptenos aproximadamente, y más típicamente entre 2 y 3. Por otra parte, un experto en la técnica apreciará que los haptenos conjugados con el anticuerpo primario pueden ser iguales o diferentes.

La muestra de tejido 100 es tratada con anticuerpos anti-hapteno 108. Por ejemplo, en la realización ilustrada en la Fig. 5, los haptenos 106, unidos con el anticuerpo primario 104, se acoplan a continuación efectivamente con un anticuerpo anti-hapteno 108, como el que puede obtener de un anticuerpo monoclonal de hibridoma de ratón. De este modo, para cada hapteno 106 acoplado al anticuerpo primario 104 habrá un anticuerpo secundario 108. Entonces se debe identificar el complejo formado por el anticuerpo anti-hapteno 108, como el anticuerpo monoclonal de ratón. Un método consiste en tratar la composición en ese momento con un anticuerpo que reconoce el anticuerpo de ratón, como un anticuerpo de cabra. En la realización ilustrada de la Fig. 5, los anticuerpos de cabra 110 se conjugan con una etiqueta detectable, como una enzima, incluyendo las enzimas de peroxidasa de rábano (HRP) 112 ilustradas. Este complejo se incubaba a continuación con un sustrato de HRP, conocido por los expertos en la técnica, para formar precipitados detectables, por ejemplo coloreados. Este proceso se puede utilizar para detectar, por ejemplo, el hibridoma.

Para detectar los anticuerpos monoclonales anti-hapteno, se obtiene una muestra de tejido, como tejido de amígdala humana normal. La muestra se puede introducir en parafina y, en ese caso, la muestra de tejido se desparafina, por ejemplo utilizando una solución VMSI EZPrep. El acondicionamiento celular y la recuperación del antígeno se realizan a continuación utilizando VMSI CC 1. Se conjugó un anticuerpo policlonal primario, como un anticuerpo humano anti-lambda (comercializado por Dako) con realizaciones de haptenos divulgadas en la presente divulgación. La conjugación se produjo típicamente en la región Fc del anticuerpo. La conjugación en la región Fc reduce la probabilidad de que la unión afecte a la especificidad del anticuerpo. Se aplica una solución que comprende una cantidad efectiva del anticuerpo primario al tejido durante un periodo de tiempo efectivo. En las realizaciones operativas la concentración efectiva ha sido aproximadamente de 10 [micro]g/ml de anticuerpo primario y el periodo de tiempo efectivo ha sido de unos 60 minutos. A continuación, se lava la muestra de tejido. Posteriormente, se aplica un potencial anticuerpo anti-hapteno (p. ej., KLH-CGT1-1.1+5-27F09-02E01) a la muestra de tejido durante un periodo de tiempo efectivo, por ejemplo de unos 60 minutos. A continuación se detecta el anticuerpo utilizando cualquier medio adecuado, como tinción VMSI Omni Map DAB.

La detección por inmunohistoquímica (IHC) automatizada de potenciales anticuerpos anti-hapteno se realizó utilizando un VMSI Discovery XT y tejido de amígdala humana integrado en parafina y fijado con formalina sobre portaobjetos de vidrio. Las muestras de tejido se desparafinan primero, se recupera el antígeno y, a continuación, se añade un anticuerpo primario unido al hapteno de interés, el potencial anticuerpo anti-hapteno y un anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección se visualiza utilizando un reactivo de detección de cromógeno de VMSI. Los portaobjetos teñidos se examinaron manualmente bajo el microscopio. Las muestras con un patrón de tinción del anticuerpo primario correcto se seleccionaron como potenciales candidatas anti-hapteno. Para probar la selectividad y especificidad, los productos de fusión celular anti-hapteno candidatos se continúan analizando utilizando anticuerpos primarios conjugados con un hapteno de una clase química diferente bajo el mismo método de tinción anteriormente detallado.

La Fig. 6 es una fotomicrografía que ilustra una tinción positiva por IHC de detección de anticuerpo anti-hapteno utilizando un anticuerpo primario conjugado con una realización divulgada de un hapteno de nitropirazol de conformidad con la presente divulgación. La Fig. 6 demuestra claramente la visualización de una diana en una muestra utilizando haptenos de conformidad con la presente divulgación acoplados a una etiqueta detectable.

La Fig. 7 es una fotomicrografía que ilustra la tinción negativa por IHC utilizando un anticuerpo anti-hapteno, como un anticuerpo anti-nitropirazol, y un anticuerpo primario conjugado con una realización divulgada de una clase de haptenos de conformidad con la presente invención, como feniltiourea. La Fig. 7 demuestra claramente la visualización de una diana en una muestra utilizando haptenos de conformidad con la presente divulgación acoplados a una etiqueta detectable.

Las realizaciones de la presente invención son útiles para la multiplexación, es decir para la detección simultánea de múltiples dianas en una muestra. Una realización de este planteamiento se ilustra esquemáticamente en la Fig. 8. La Fig. 8 ilustra que una muestra, como una muestra de tejido 120, puede tener múltiples dianas, incluyendo: Ki-67 (122) [un antígeno de proteína que se acumula de la fase G1 a la mitosis, donde se encuentra a su concentración máxima. Durante la interfase, la proteína Ki-67 está predominantemente asociada con los nucleolos. Durante la mitosis muestra una estrecha asociación con los cromosomas. Ki-67 está presente en los núcleos de las células que proliferan (fase G1, S, G2 y mitosis), aunque no en los núcleos de las células que están quietas (fase G0). Recientemente se ha demostrado que la proteína Ki-67 pertenece a la familia de los antígenos MPM-2 y que la fosforilación de la proteína Ki-67 durante la mitosis está asociada con la condensación de los cromosomas y la separación de cromátidas hermanas. Un dominio C-terminal de la proteína Ki-67 se puede unir a los tres miembros de familia de la proteína de heterocromatina de mamífero 1 (HP1) in vitro e in vivo, lo que sugiere que la proteína Ki-67 participa en el control de la estructura de la cromatina de orden superior; el antígeno de CD3 (124) [CD3 es un complejo de proteína compuesto por tres cadenas distintas (CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ) en mamíferos, que se asocian con

los receptores de linfocitos T (TCR) para generar una señal de activación en los linfocitos T. Los TCR, la cadena de ζ y las moléculas de CD3 forman juntos el complejo de TCR. Las cadenas de CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ son proteínas de la superficie celular altamente relacionadas]; proteína kappa (126); CD20 (128) [un antígeno expresado en linfocitos B humanos malignos y normales que se cree que funciona como receptor durante la activación del linfocito B]; antígeno CD-68 (130) [una proteína transmembrana altamente glicosilada de 110 kDa que se encuentra fundamentalmente en los lisosomas]; y proteína lambda (132). A continuación se selecciona un anticuerpo para cada una de las dianas 122, 124, 126, 128, 130 y 132 y se añade a la muestra de tejido 1200 de forma efectiva para conseguir el reconocimiento del anticuerpo de la diana. Por ejemplo, Ki-67 (122) puede ser reconocida por un anticuerpo primario 134 conjugado con hapteno de BF 136. A continuación se añade un anticuerpo monoclonal anti-BF 138 a la muestra de manera efectiva para conseguir el reconocimiento del hapteno de BF por parte del anticuerpo anti-BF 138. El anticuerpo monoclonal anti-BF 138 incluye una etiqueta detectable 140, como el Qdot 585. Los espectros de emisión de colores de diversos Qdots se proporcionan en www.niaid.nih.gov/vrc/pdf/fig3_qdot_spectra.pdf. El Qdot 585 produce una luz de color amarillo anaranjado. Un experto en la técnica apreciará que este proceso se puede variar con respecto al descrito. Por ejemplo, el hapteno 136 no tiene que ser BF, ni la etiqueta detectable 140 el Qdot 585, y ni siquiera tiene que ser un Qdot. Por lo contrario, se pueden emplear todas las diversas combinaciones de haptenos y fracciones generadoras de señales descritas en el presente y conocidas por un experto en la técnica para la práctica de la invención.

Con respecto siempre a la Fig. 7, CD3 (124) se puede reconocer mediante un anticuerpo primario 142 conjugado con biotina 144. Esta característica ilustra otra realización de la presente divulgación en la que se pueden utilizar agentes conocidos, como biotina, en combinación con realizaciones divulgadas de haptenos, conjugados de haptenos y composiciones de los mismos. An anticuerpo monoclonal anti-biotina 146 se añade a continuación a la muestra de forma efectiva para permitir el reconocimiento de biotina mediante el anticuerpo anti-biotina 146. El anticuerpo monoclonal anti-biotina 146 incluye una etiqueta detectable, 148, como el Qdot 525, que produce un color verde azulado.

Kappa (126) se puede reconocer mediante un anticuerpo primario 150 conjugado con hapteno de dinitrofenilo 152. A continuación, se añade un anticuerpo monoclonal anti-DNP 154 a la muestra de manera efectiva para permitir el reconocimiento del hapteno de DNP mediante el anticuerpo anti-DNP 154. Un anticuerpo monoclonal anti-biotina 154 incluye una etiqueta detectable 156, como el Qdot 605, que produce un color naranja.

CD20 (128) puede ser reconocido mediante un anticuerpo primario 158 conjugado con hapteno de nitrofenilo 160. A continuación, se añade un anticuerpo monoclonal anti-NP secundario 162 a la muestra, de manera efectiva para permitir el reconocimiento de NP 160 por parte del anticuerpo anti-NP 162. El anticuerpo monoclonal anti-NP 162 incluye una etiqueta detectable 164, como el Qdot 655, que produce un color rojo claro.

CD-68 (130) puede ser reconocido mediante un anticuerpo primario 166 conjugado con hapteno de TS 168. A continuación se añade un anticuerpo monoclonal anti-TS secundario 170 a la muestra, de manera efectiva para permitir el reconocimiento de TS 168 por parte del anticuerpo anti-TS 170. El anticuerpo monoclonal anti-TS 170 incluye una etiqueta detectable 172, como un Qdot 565, que produce un color verde claro.

Lambda (132) puede ser reconocido por un anticuerpo primario 174 conjugado con hapteno de rotenona 176. A continuación, se añade un anticuerpo monoclonal anti-rotenona secundario 178 a la muestra, de una manera efectiva para permitir el reconocimiento de la rotenona 176 por parte del anticuerpo anti-rotenona 178. El anticuerpo monoclonal anti-rotenona 178 incluye una etiqueta detectable 180, como el Qdot 705, que produce un color rojo oscuro. De este modo, al utilizar fracciones generadoras de señales diferentes, se pueden visualizar varias dianas diferentes en la muestra de forma sustancialmente simultánea, o secuencial, según se desee.

Las realizaciones operativas han utilizado múltiples haptenos diferentes, y anticuerpos contra estos haptenos, para visualizar una diana detectable.

La Fig. 9 ilustra los resultados de este planteamiento. La Fig. 9 es la imagen de una tinción producida utilizando múltiples haptenos y anticuerpos contra los mismos. La Fig. 9 muestra claramente la visualización de la proteína.

Las realizaciones de la presente invención también son útiles para implementar un tipo diferente de multiplexación, es decir la detección simultánea de múltiples tipos de dianas diferentes, como dianas de proteína y ácido nucleico, en una muestra. Esto se ilustra esquemáticamente en la FIG. 10 con referencia a Her2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2). Her2 es un gen que ayuda a controlar cómo crecen, se dividen y reparan las células. El protooncogén Her2 codifica una glucoproteína transmembrana de 185 kDa con actividad tirosina quinasa intrínseca. La amplificación del gen Her2 y la sobreexpresión de su producto induce la transformación celular. Numerosos estudios han demostrado la relevancia para el pronóstico de p185(Her2), cuya sobreexpresión se produce en el 10% al 40% de los tumores de mama humanos.

La Fig. ilustra una captura de imágenes fluorescentes. Tal y como se ilustra en la Fig. 10, una sonda de Her2 200 etiquetada con hapteno se añade a una muestra de manera efectiva para permitir que la sonda forme un complejo con el gen Her2. La sonda 200 incluye un hapteno 202 que puede ser cualquier hapteno conocido, incluyendo realizaciones de los haptenos divulgados en el presente. La Fig. 10 ilustra el uso de hapteno de dinitrofenilo 202. El gen del complejo se trata a continuación con un anticuerpo anti-hapteno 204. El anticuerpo anti-hapteno 204 incluye una etiqueta detectable 206, como Qdot 565.

Un anticuerpo 208 anti-proteína Her2, como un anticuerpo de conejo 4B5 anti-Her2, se añade a la muestra de manera efectiva para permitir el reconocimiento de la proteína Her2. El anticuerpo 208 anti-Her2 incluye al menos un hapteno 210 y potencialmente varios haptenos 210, que pueden ser iguales o diferentes. La realización mostrada en la Fig. 10 ilustra el proceso utilizando biotina. A continuación, se añade un anticuerpo secundario 212 anti-hapteno a la muestra de una manera efectiva para permitir la formación de un complejo del anticuerpo secundario 212 con el hapteno o haptenos 210. El anticuerpo secundario 212 anti-hapteno incluye una etiqueta detectable 214, como Qdot 655. De este modo, la realización ilustrada en la Fig. 10 permite la detección multiplexada del gen y el producto del gen.

La Fig. 11 ilustra los resultados de esta detección cromogénica multiplexada. La Fig. 11 es la imagen de una tinción que ilustra la detección de proteína y 2 genes, por ejemplo utilizando anticuerpos anti-biotina y anti-dinitrofenilo.

IX. Kits de ensayo

Las realizaciones de la presente divulgación proporcionan, en parte, kits para la práctica de diversas realizaciones del método de la invención. Algunos ejemplos de estos kits incluyen aquellos útiles para realizar análisis de colesterol, kits de embarazo, kits de diagnóstico del cáncer, etc. Los kits de ensayo de la presente divulgación contienen típicamente un conjugado de hapteno de conformidad con la presente divulgación, como al menos un conjugado de molécula de unión específica-hapteno, incluyendo conjugados de anticuerpo-hapteno y/o conjugados de sonda de ácido nucleico-hapteno, así como un anticuerpo anti-hapteno, particularmente un anticuerpo anti-hapteno conjugado con una etiqueta detectable.

Como ejemplo específico, se proporcionan kits para caracterizar la respuesta de tumores de mamífero a los tratamientos con fármacos, tales como inhibidores. Algunos ejemplos concretos incluyen, a título meramente enunciativo, un inhibidor de las vías de mTOR y un inhibidor doble de las vías de mTOR y de las vías de EGR que comprende al menos dos reactivos, preferiblemente anticuerpos, que pueden detectar la expresión, fosforilación, o ambas cosas de los polipéptidos en las vías de EGF, las vías de mTOR, o ambas. Por ejemplo, el kit puede contener al menos dos, tres o cuatro reactivos que se unen a una forma fosforilada de ERK, que se une a la forma fosforilada de MEK, que se une a HIF-1 α , o que se une a mTOR. Asimismo, el kit puede incluir componentes adicionales distintos de los reactivos anteriormente identificados, incluyendo, a título meramente enunciativo, anticuerpos adicionales. Estos kits pueden ser utilizados, por ejemplo, por un médico para seleccionar una terapia apropiada para un determinado paciente.

X. Realizaciones automatizadas

Un experto en la técnica apreciará que las realizaciones del método divulgado en el presente para el uso de conjugados de haptenos se puede automatizar. Ventana Medical Systems, Inc. es la cesionaria de diversos sistemas y métodos para la realización de análisis automatizados divulgados en patentes estadounidenses, entre las que se incluyen las Patentes estadounidenses n^o 5.650.327 , 5.654.200 , 6.296.809 , 6.352.861 , 6.827.901 y 6.943.029 , y las Solicitudes publicadas estadounidenses n^o 20030211630 y 20040052685 , quedando todas ellas incorporadas al presente por referencia.

Determinadas realizaciones de procedimientos de tinción de haptenos se realizaron utilizando diversos procesos automatizados. En los ejemplos operativos se proporcionan más detalles sobre los ejemplos de realizaciones operativas.

XI. Ejemplos operativos

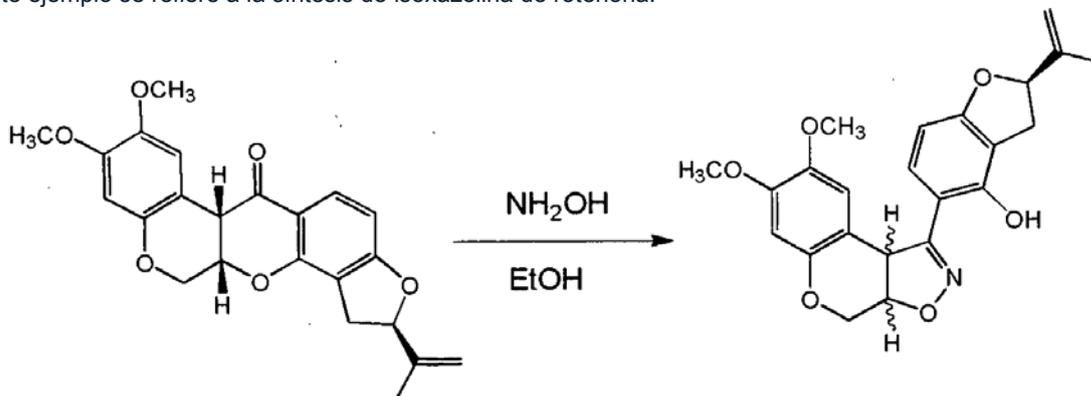
Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características específicas de las realizaciones operativas. El ámbito de aplicación de la presente invención no se limita a las características ejemplificadas por los siguientes ejemplos.

Materiales

El DTT se compró en Aldrich y los quantum dots se compraron en Quantum Dot, Co. y se utilizaron tal cual se recibieron. NH₂-dPEG₈-CO₂H, NH₂-dPEG₈-OH, NHS-dPEG₁₂-MAL y NHS-dPEG₄-MAL se compraron en Quanta BioDesign. El anticuerpo de cabra anti-biotina se recibió liofilizado de Sigma. Las concentraciones de anticuerpo se calcularon utilizando $\epsilon_{280} = 1.4 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Las concentraciones de quantum dot se determinaron utilizando $\epsilon_{601}(\pm 3) = 650 \text{ 000 M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para quantum dots de emisión 605 nm (QD₆₀₅) y $\epsilon_{645}(\pm 3) = 700 \text{ 000 M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para QD 655. El agua desionizada se pasó a través de un Milli-Q Biocel System para alcanzar una resistencia de 18,2 M Ω . El intercambio de solución tampón se realizó en columnas PD-10 (GE Biosciences). La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizó en purificadores Akta (GE Biosciences) que se calibraron con estándares de proteínas de peso molecular conocido. La velocidad de flujo fue de 0,9 ml/min en Superdex 200 GL 10/300 (GE Biosciences) con PBS, pH 7.5.

Ejemplo 1

Este ejemplo se refiere a la síntesis de isoxazolina de rotenona.

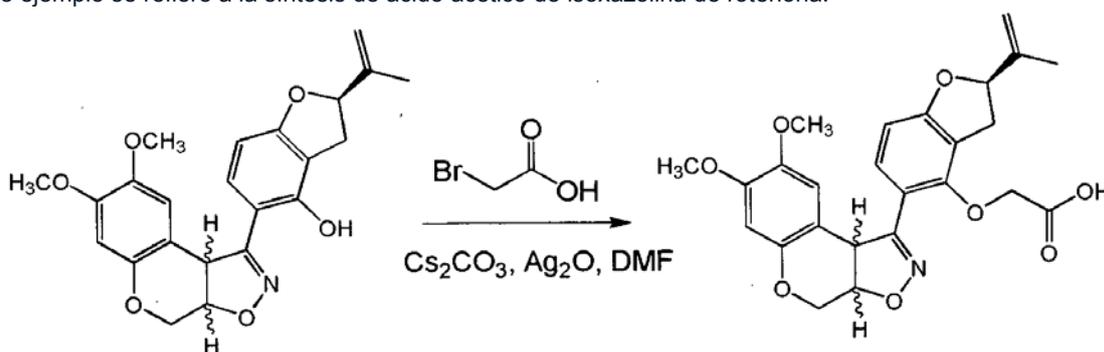


5

La rotenona (20,00 g, 50,7 mmol, 1,0 eq.) y el hidrocloreto de hidroxilamina (35,20 g, 507 mmol, 10,0 eq.) se suspendieron/disolvieron en etanol absoluto (600 mL). Se añadió una solución de hidróxido de sodio (24,30 g, 608 mmol, 12 eq.) en agua (120 mL) a la suspensión agitada y se sometió a reflujo durante tres horas. Después de enfriar la reacción hasta alcanzar la temperatura ambiente, la solución se filtró y el filtrado se redujo en vacío hasta un volumen de aproximadamente 150 ml. El filtrado reducido se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo tres veces con cloruro de metileno (200 ml cada vez). Los lavados de cloruro de metileno fueron combinados, secados con sulfato de magnesio anhidro, filtrados y el solvente se retiró por vacío. El material resultante (20 g) se colocó en cloruro de metileno (10 ml) y se purificó mediante cromatografía flash (Isco Combiflash) utilizando una columna de 330 gramos y eluyendo con un cloruro de metileno con un gradiente de metanol/cloruro de metileno del 20%. El compuesto deseado (6,17 g, 30%) se aisló como la fracción de elución más temprana. La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante ¹H/¹³C-NMR y MS.

Ejemplo 2

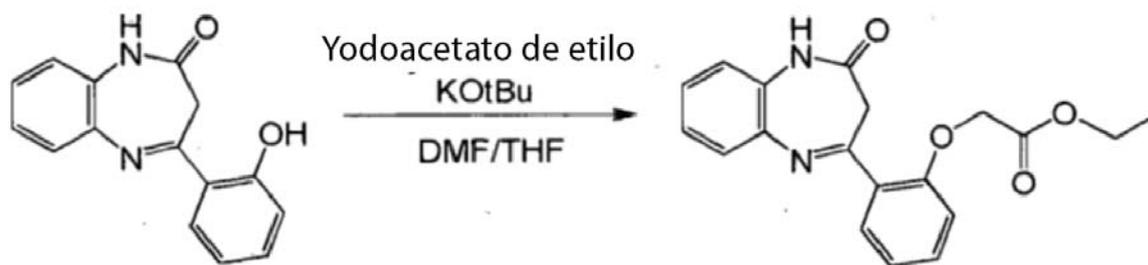
Este ejemplo se refiere a la síntesis de ácido acético de isoxazolina de rotenona.



La isoxazolina de rotenona (3,53 g, 8,62 mmol, 1,0 eq.) se agitó/suspendió en dimetilformamida anhidro (80 ml). Se añadió ácido bromoacético (28,10 g, 86,2 mmol, 10,0 eq.) bajo nitrógeno. Se añadieron carbonato de cesio (28,1 g, 86,2 mmol, 10,0 eq.) y óxido de plata (2,99 g, 12,9 mmol, 1,5 eq.) y la reacción se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 21 horas. La mezcla de la reacción se diluyó con cloruro de metileno (120 ml), se filtró y el solvente se retiró mediante vacío. El residuo se colocó en cloruro de metileno (15 ml) y se sometió a cromatografía (Isco CombiFlash) utilizando una columna Redisep de 120 gramos con un gradiente de metanol de entre 0 y 10% en cloruro de metileno. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se combinaron y concentraron bajo vacío para obtener 2,98 g (74%). La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante ¹H/¹³C-NMR y MS.

Ejemplo 3

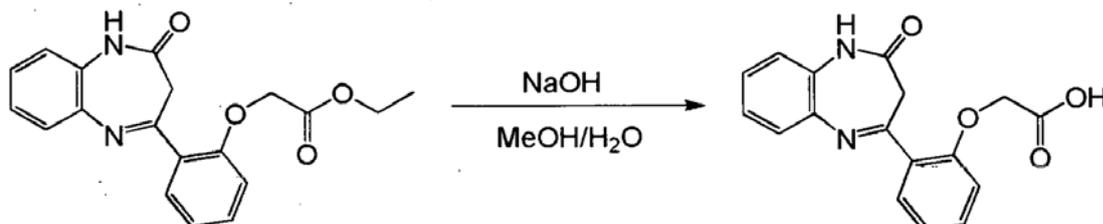
El presente ejemplo se refiere a la síntesis de éster de diazapinona.



5 Se agitó y suspendió 1,3-Dihidro-4-(2-hidroxifenil)-2H-1,5-benzodiazapin-2-ona (2,837 g, 11,2 mmol, 1,0 eq) en 40 ml de DMF, se añadieron 34 ml (34 mmol, 3,0 eq) de una solución 1,0 M (en THF) de terc-butóxido de potasio, se añadieron 1,6 ml (13,5 mmol, 1,2 eq) de yodoacetato etílico y la reacción se agitó con N₂ durante 3 horas. A continuación, se añadieron otros 1,6 ml (13,5 mmol, 1,2 eq) de yodoacetato etílico y se agitó de forma continua durante 2 horas. La reacción se vertió en 100 ml de agua y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Los extractos de EtOAc se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se retiró el solvente en vacío y el aceite resultante se purificó mediante cromatografía flash, eluyendo con EtOAc/hexano (20/80). Se obtuvieron 806 mg (21% de rendimiento). La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante NMR y MS.

Ejemplo 4

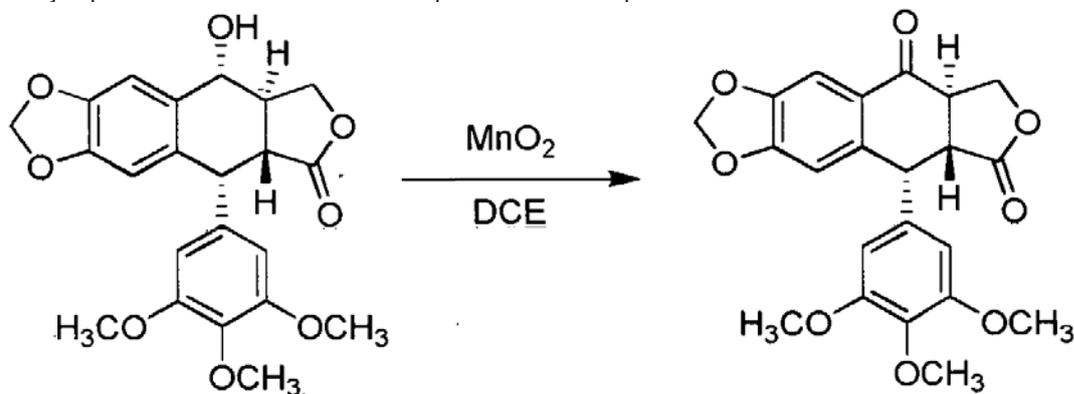
Este ejemplo se refiere a la síntesis de ácido de diazapinona.



15 El éster de diazapina (999 mg, 2,95 mmol, 1,0 eq) se disolvió en 30 ml de MeOH, se añadieron 944 mg (23,6 mmol, 8,0 eq) de hidróxido de sodio en 15 ml de agua y la reacción se agitó durante 40 minutos. A continuación, la reacción se diluyó con 75 ml de agua, el pH se ajustó hasta un nivel inferior a 4 con 6 M HCl, y se extrajo con EtOAc (3 x 75 mL). Los extractos de EtOAc se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ y el solvente se retiró en vacío. Se obtuvieron 865 mg (94% de rendimiento). La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante NMR y MS.

Ejemplo 5

Este ejemplo se refiere a la síntesis de oxipodofilotoxina de podofilotoxina.



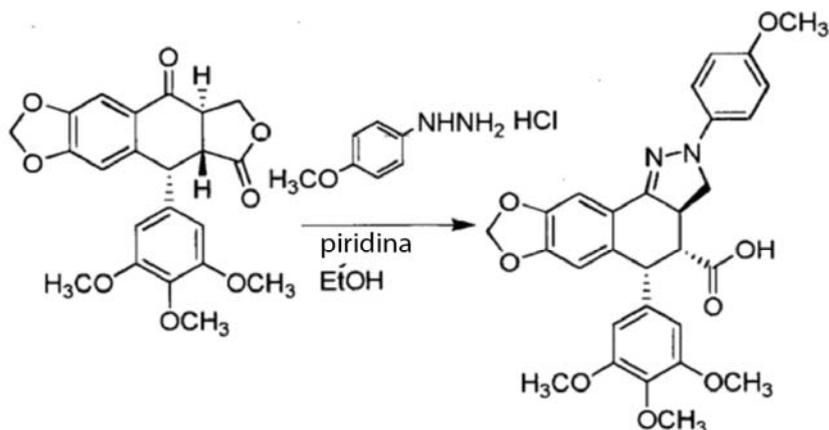
25 La podofilotoxina (3,15 g, 7,61 mmol, 1,0 eq) se disolvió en 500 ml de DCE, se añadió óxido de manganeso (IV) (6,6 g, 76 mmol, 10 eq.) y la mezcla de la reacción se sometió a reflujo durante una hora. Se añadió más óxido de manganeso (IV) (6,6 g, 76 mmol, 10 eq.) y se mantuvo el reflujo durante 5 horas más. A continuación, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. A continuación, se filtró la reacción con Celite para obtener una solución de color marrón rojizo, el solvente filtrado se retiró en vacío y el residuo resultante se recrystalizó partiendo

30

de EtOH. Se obtuvieron 1,968 g (63% de rendimiento). La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante NMR y MS.

Ejemplo 6

5 Este ejemplo se refiere a la síntesis de ácido pirazopodofílico.

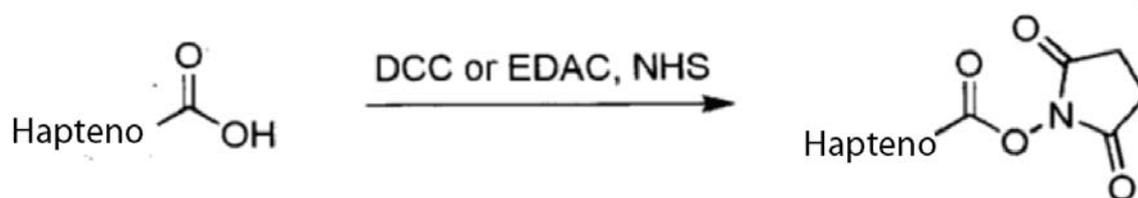


10 Se agitó y resuspendió oxopodofiloxina (200 mg, 0,485 mmol, 1,0 eq) en 10 ml de EtOH. Se añadió hidrocloreto de metoxifenil hidrazina (110 mg, 0,631 mmol, 1,3 eq), se añadió piridina (0,300 ml, 3,71 mmol, 7,6 eq) y la mezcla de la reacción se agitó en N_2 , a 95 °C, durante 18 horas. A continuación, se dejó enfriar la reacción, se vertió en 20 ml de bicarbonato sódico saturado y se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Los extractos de EtOAc se combinaron, se secaron sobre $MgSO_4$, se retiró el solvente en vacío y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash, eluyendo con DCM/MeOH (98/2). Se obtuvieron 121mg (47% de rendimiento). La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante NMR y MS.

15

Ejemplo 7

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de síntesis de ésteres de N-hidroxisuccinimidil de ácido carboxílico de hapteno.

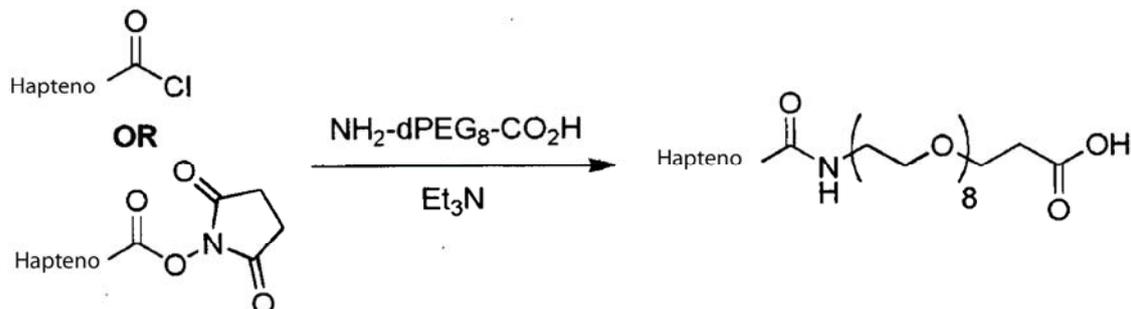


20 El ácido carboxílico de hapteno (5,0 mmol, 1,0 eq.) se colocó en 10 ml de DCM seco en un matraz de fondo redondo de 50 ml. La solución se cubrió con nitrógeno seco y se añadió NHS (5,5 mmol, 1,1 eq.), seguido de 1,0 M DCC en DCM (6,0 mmol, 1,2 eq.), y trietilamina (6,0 mmol, 1,2 eq.). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno seco durante 16 horas y se extrajo el solvente bajo vacío. El residuo se colocó en 2 ml de DCM seco y se filtró para retirar el subproducto de urea. El producto filtrado se lavó dos veces con 0,5 ml de DCM seco. Las porciones de DCM combinadas se secaron a continuación bajo vacío para obtener el éster de NHS de hapteno, que se utilizó sin ninguna purificación posterior.

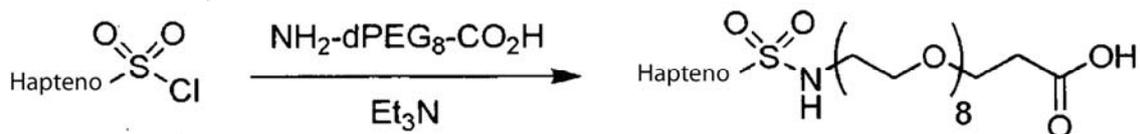
25

Ejemplo 8

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de síntesis de ácidos carboxílicos-dPEG8-hapteno.



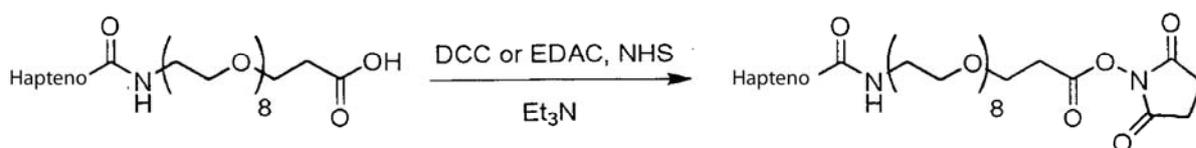
10 El éster de NHS de hapteno o cloruro de acilo de hapteno (5,0 mmol, 1,0 eq.) se colocó en 10 ml de DCM seco en un matraz de fondo redondo de 50 ml. La solución se cubrió con nitrógeno seco y se añadió ácido carboxílico-dPEG8-amino (5,5 mmol, 1,1 eq.) seguido de trietilamino (6,0 mmol, 1,2 eq.). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno seco durante 16 horas y se extrajo el solvente bajo vacío. El residuo se colocó en metanol mínimo y se purificó mediante HPLC preparativa. A continuación, se combinaron las fracciones apropiadas y se secaron en vacío para obtener el ácido-dPEG8-hapteno puro.



Alternativamente, los haptenos que tienen una fracción de cloruro de sulfonilo, como los haptenos basados en tiazol del Esquema 10 y los haptenos basados en azoarilo del Esquema 15, se podrían acoplar directamente con ácido carboxílico-dPEG8-amino bajo la misma estequiometría y condiciones de reacción para producir ácido carboxílico-dPEG8-sulfamida de hapteno.

Ejemplo 9

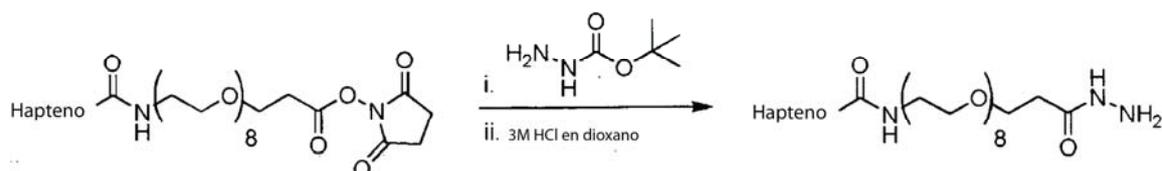
20 Este ejemplo se refiere a un ejemplo de síntesis de ésteres de N-hidroxisuccinimidil de ácido carboxílico-dPEG8-hapteno



30 El ácido carboxílico-dPEG8-hapteno (5,0 mmol, 1,0 eq.) se colocó en 10 ml de DCM seco en un matraz de fondo redondo de 50 ml. La solución se cubrió con nitrógeno seco y se añadió NHS (5,5 mmol, 1,1 eq.), seguido de 1,0 M DCC en DCM (6,0 mmol, 1,2 eq.), y trietilamina (6,0 mmol, 1,2 eq.). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno seco durante 16 horas y se extrajo el solvente bajo vacío. El residuo se colocó en 2 ml de DCM seco y se filtró para retirar el subproducto de urea. El producto filtrado se lavó dos veces con 0,5 ml de DCM seco. Las porciones de DCM combinadas se secaron a continuación en vacío, para obtener el éster de NHS-dPEG8-hapteno que se utilizó sin ninguna purificación posterior.

Ejemplo 10

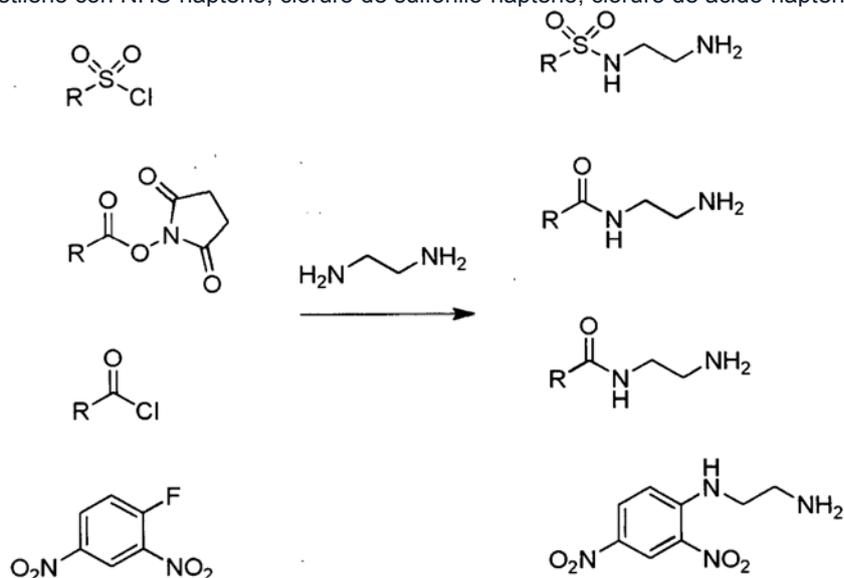
Este ejemplo se refiere a un ejemplo de síntesis de hidrazidas-dPEG8-hapteno.



- 5 El éster de NHS-dPEG₈-hapteno (1,0 mmol, 1,0 eq.) se colocó en 5 ml de DCM seco en un matraz de fondo redondo de 25 ml. La solución se cubrió con nitrógeno seco y se añadió BOC-hidrazida (1,2 mmol, 1,2 eq.). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno seco durante 16 horas y se extrajo el solvente bajo vacío. El residuo se colocó en 10 ml de 4N HCl en dioxano y se agitó a temperatura ambiente durante tres horas. A continuación se retiró el solvente en vacío y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa para obtener la hidrazida-dPEG₈-hapteno pura.

Ejemplo 11

- 10 Los siguientes ejemplos se refieren a un ejemplo de síntesis de etilaminas-hapteno, haciendo reaccionar diamina de etileno con NHS-hapteno, cloruro de sulfonilo-hapteno, cloruro de ácido-hapteno o 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno.

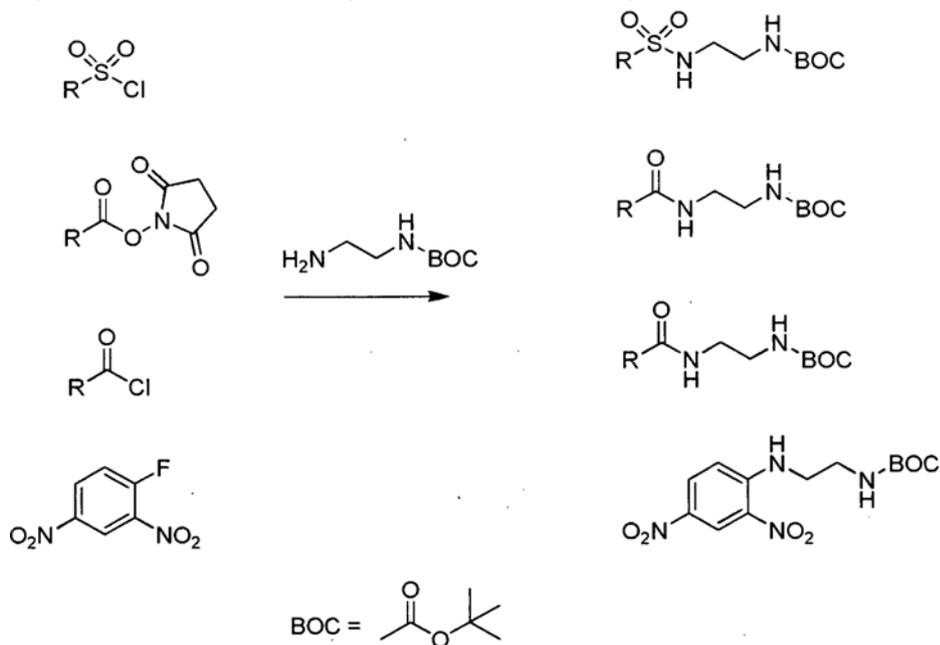


- 15 El éster de NHS-hapteno, cloruro de sulfonilo-hapteno, cloruro de ácido-hapteno o 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (1 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en cloruro de metileno anhidro (10 ml) y se añadió gota a gota a una solución de diamina de etileno (20 mmol, 20 eq.) en cloruro de metileno anhidro (10 ml) bajo nitrógeno y en condiciones ambiente. La mezcla de la reacción se agitó durante una hora y el solvente se retiró en vacío. El residuo se colocó en un solvente apropiado y se sometió a cromatografía en gel de sílice para cromatografía flash o HPLC preparativa. Los rendimientos típicos fueron del 30-60%. La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante ¹H/¹³C-NMR y MS.

20

Ejemplo 12

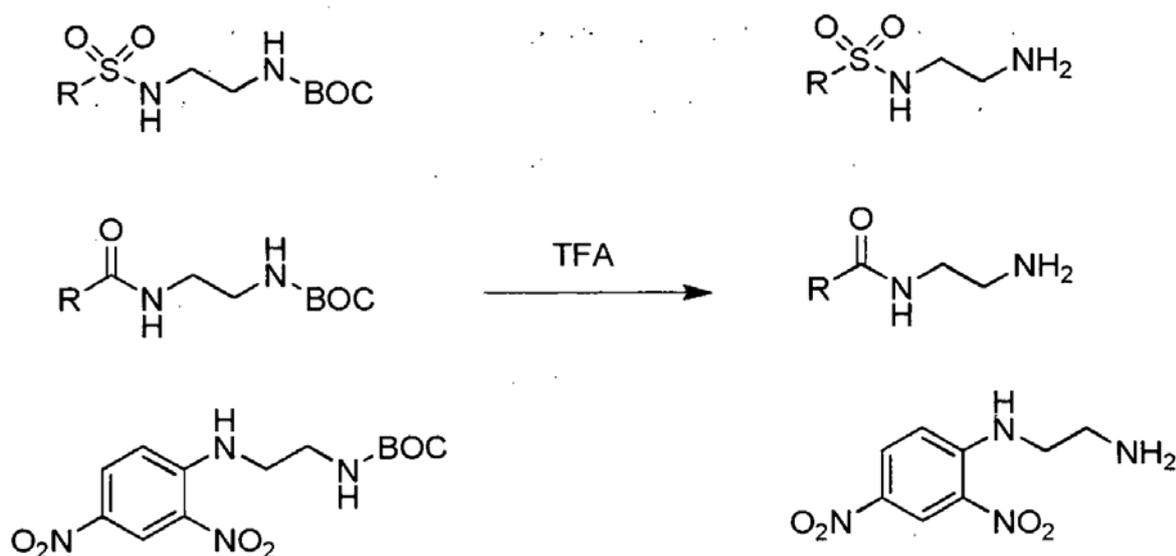
El presente ejemplo se refiere a la reacción de diamina de etileno de N-butoxicarbonilo con un éster de NHS-hapteno, cloruro de sulfonilo-hapteno, cloruro de ácido-hapteno o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno.



- 5 El éster de NHS-hapteno, cloruro de sulfonilo-hapteno, cloruro de ácido-hapteno o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno (1,0 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en cloruro de metileno anhidro (10 ml) y se añadió gota a gota a una solución de diamina de etileno de N-butoxicarbonilo (1,0 mmol, 1,0 eq.) en cloruro de metileno anhidro (10 mL) con nitrógeno y en condiciones ambientales. La mezcla de la reacción se agitó durante dos horas y el solvente se retiró en vacío. El residuo se colocó en un solvente apropiado y se sometió a cromatografía en gel de sílice para cromatografía flash o HPLC preparativa. Los rendimientos típicos fueron del 20-40%. La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR y MS.
- 10

Ejemplo 13

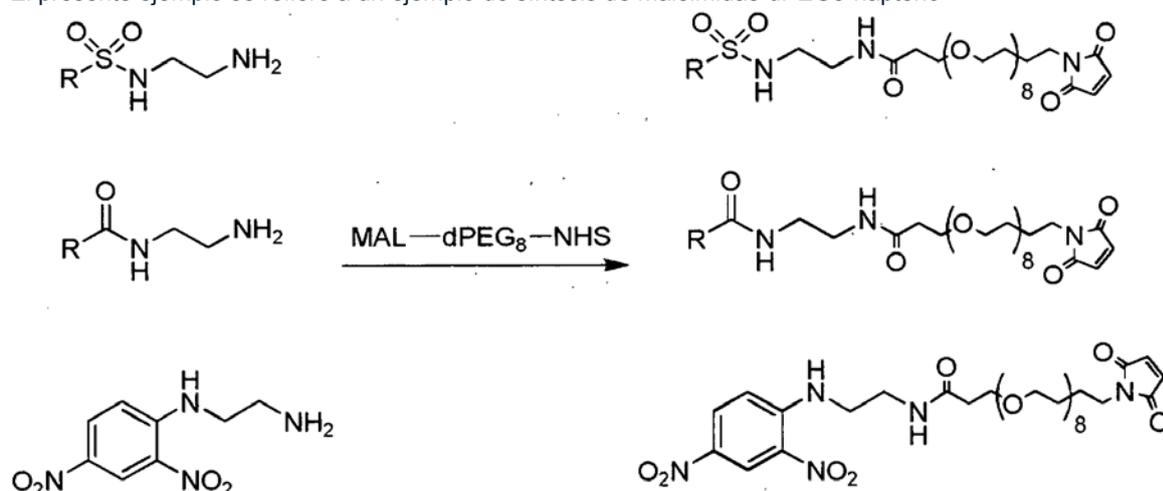
El presente ejemplo se refiere a la desprotección de los compuestos de diamina de etileno-BOC-hapteno.



- 15 Se disolvió diamina de etileno-BOC-hapteno (1,0 mmol, 1,0 eq.) en cloruro de metileno anhidro (2,0 ml). Se añadió ácido trifluoroacético (2,0 ml) en condiciones ambientales y se agitó durante 30 minutos. El solvente se retiró en vacío a peso constante y el material se utilizó sin ninguna purificación anterior. Los rendimientos típicos fueron del 90-95%. La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR y MS.

20 Ejemplo 14

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de síntesis de maleimid-dPEG8-hapteno

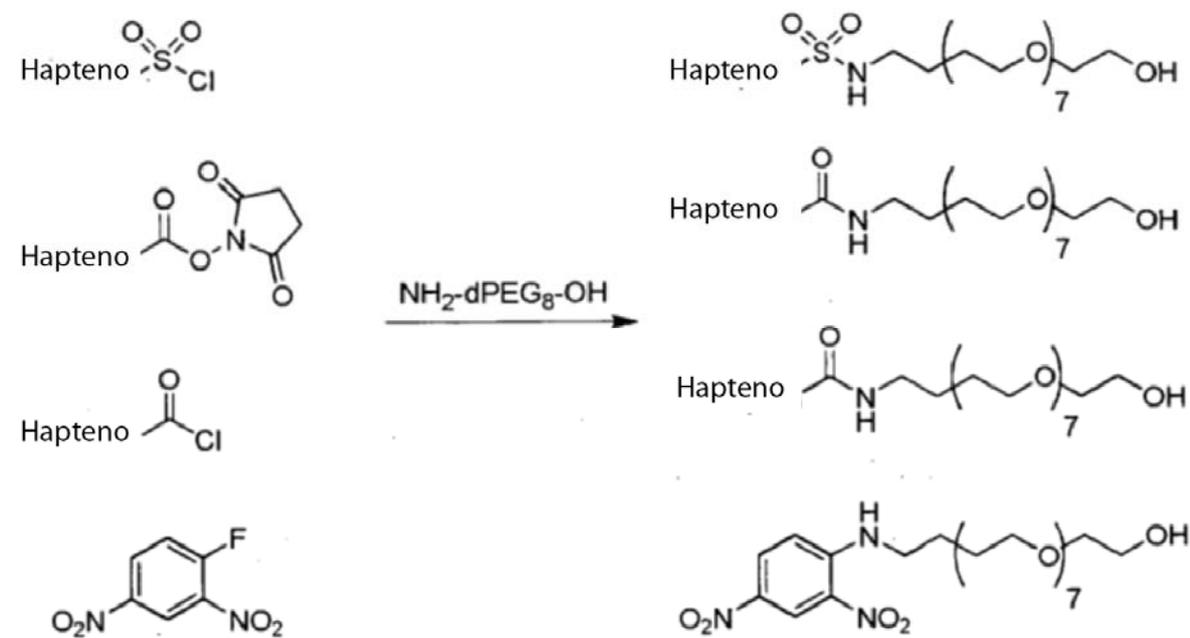


5 El derivado de diamina de etileno-hapteno (1,0 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en formamida de dimetilo anhidro (5,0 ml), se añadió trietilamina (4,0 mmol, 4,0 eq.) y se agitó en condiciones ambiente bajo nitrógeno. Se disolvió MAL-dPEG₈-NHS (1,0 mmol, 1,0 eq., Quanta BioDesign) en formamida de dimetilo anhidro (5,0 ml) y se añadió a la solución de diamina de etileno-hapteno. La reacción se agitó en condiciones ambiente bajo nitrógeno hasta el día siguiente. Se retiró el solvente bajo vacío y se purificó mediante HPLC preparativa. Los rendimientos típicos fueron del 70-90%. La pureza se determinó mediante HPLC y la estructura mediante ¹H/¹³C-NMR y MS.

10

Ejemplo 15

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de síntesis de alcoholes dPEG7-hapteno.

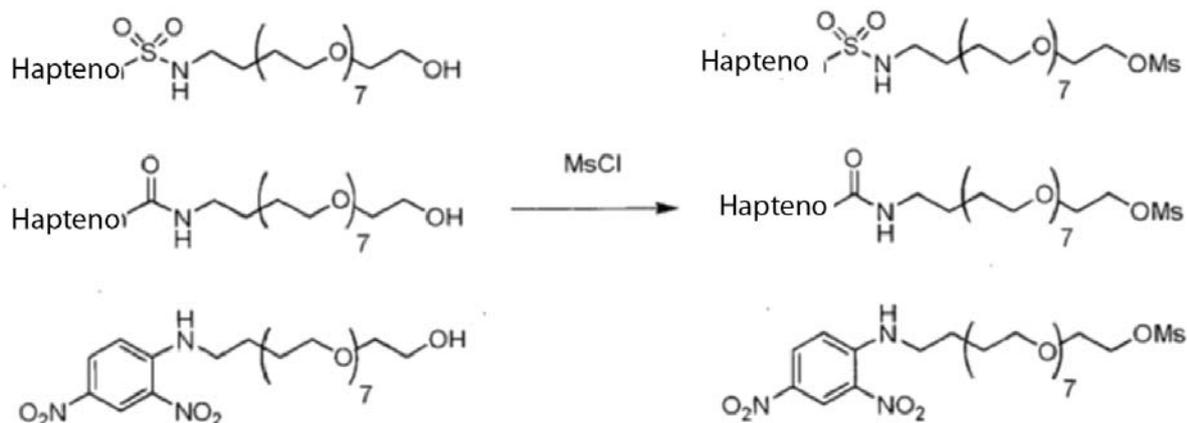


15 En un matraz RB de 25 ml, se hace reaccionar el éster de NHS-hapteno, cloruro de sulfonilo-hapteno, cloruro de ácido-hapteno o 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (1,0 eq., 2,7 mmol) con alcohol-dPEG₇-amino (1,0 eq., 2,7 mmol, Quanta BioDesign) en 5 ml de DMF seco. A continuación, se cubre la reacción con nitrógeno seco y se agita en condiciones ambientales durante 16 horas. Se retira el solvente en vacío y el alcohol diana se purifica mediante cromatografía en gel de sílice o HPLC preparativa. La pureza e identidad del producto se determinó mediante HPLC, MS, y ¹H/¹³C-NMR.

20

Ejemplo 16

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento de mesilatos-dPEG7-hapteno.

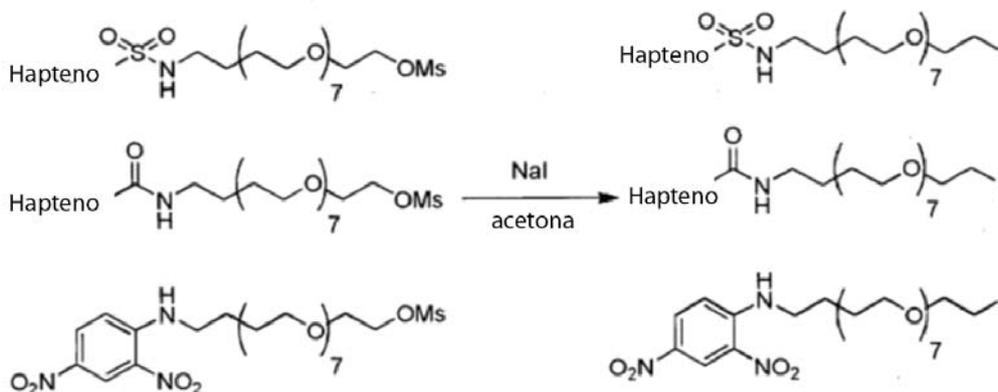


5 El alcohol-dPEG₇-hapteno se colocó en DMF anhidro (7ml) en un matraz RB de 25 ml. El matraz se purgó con nitrógeno seco y se añadió cloruro de mesilo (1,1 eq.) con una jeringuilla. La solución se agitó a temperatura ambiente durante dos minutos, antes de añadir trietilamina anhidro (2,2 eq.) durante aproximadamente 20 minutos. La reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente antes de retirar el solvente en vacío. El residuo se colocó en DCM seco y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para obtener el mesilato tras retirar el solvente en vacío. La pureza e identidad del producto se determinó mediante HPLC, MS, y ¹H/¹³C-NMR.

10

Ejemplo 17

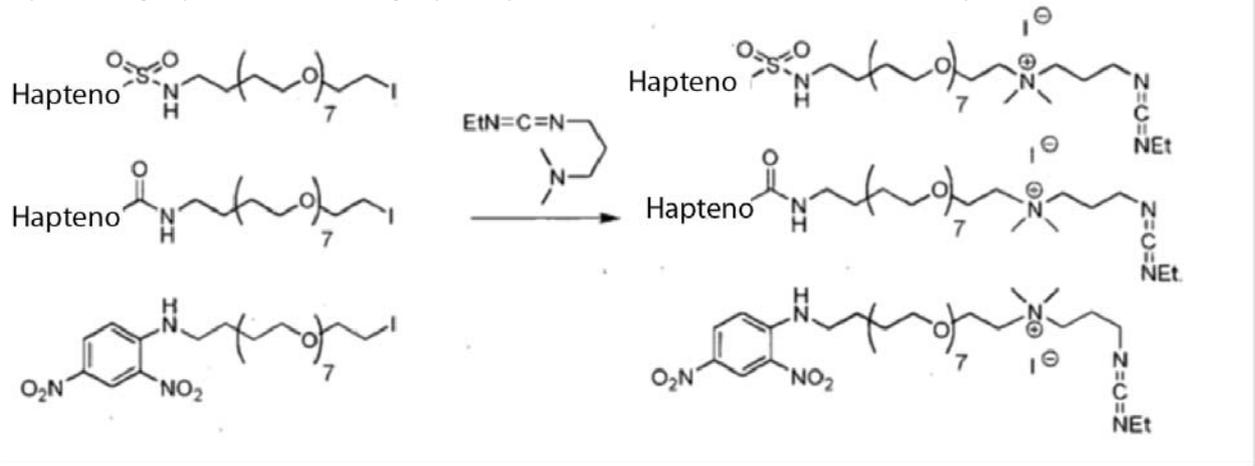
El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento de yoduros-dPEG₇-hapteno.



15 El mesilato-dPEG₇-hapteno se disolvió en acetona seca (10 ml) y se convirtió en yoduro por reflujo en presencia de yoduro de sodio (10 eq.) durante tres horas. El yoduro puro se obtuvo tras la cromatografía en gel de sílice. La pureza e identidad del producto se determinó mediante HPLC, MS, y ¹H/¹³C-NMR.

Ejemplo 18

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento de carbodiimidas-dPEG₇-hapteno.

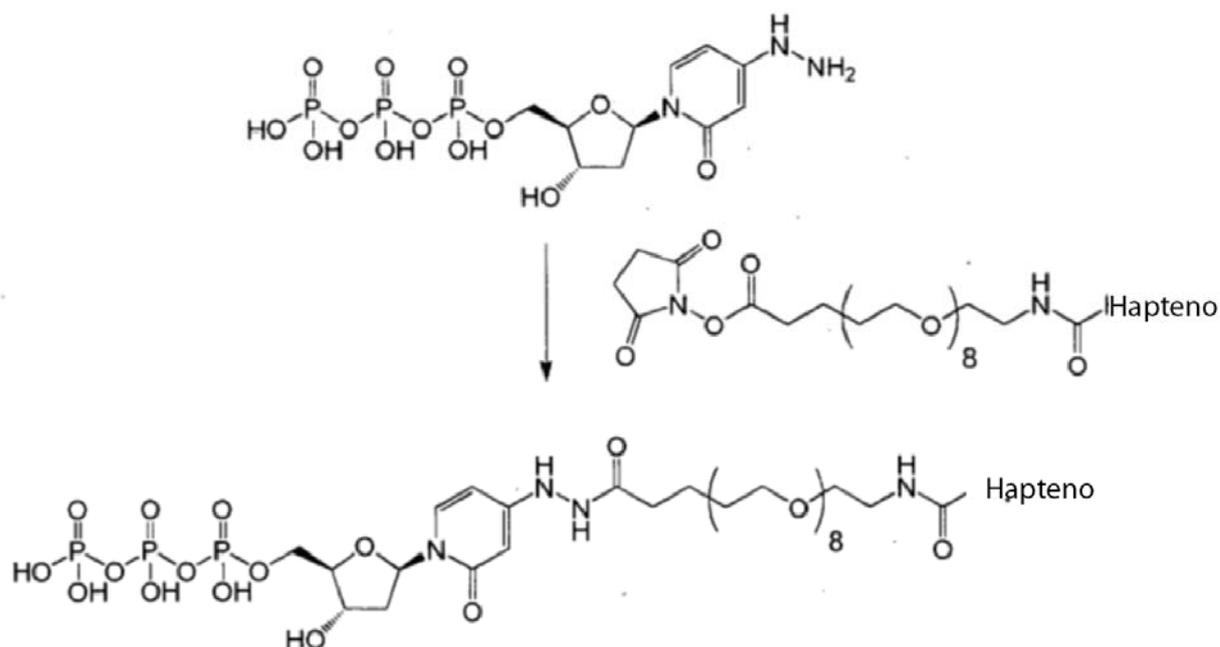


5 El yoduro-dPEG₇-hapteno se disolvió en DMF seco (10 ml) y se trató con carbodiimida de etil-N,N-dimetilpropilo (10 eq.) en nitrógeno. Tras agitar a temperatura ambiente en nitrógeno seco durante 16 horas, el solvente se retiró en vacío para obtener un sistema bifásico compuesto por la carbodiimida deseada y la carbodiimida de etil-N,N-dimetilpropilo sobrante. Esta última se decantó y el producto deseado se secó en vacío. La pureza e identidad del producto se determinó mediante HPLC, MS, y ¹H/¹³C-NMR.

10

Ejemplo 19

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento para generar un hapteno-dPEG⁸-4-amino-desoxicitidina trifosfato.



5

Se disolvió 4-amino-desoxicitidina trifosfato (1,0 eq. como sal de trietilamonio) en DMSO anhidro para producir una solución 0,01M. Se añadió una solución de NHS-dPEG₈-hapteno (1,1 eq.) en DMSO anhidro al 4-amino-desoxicitidina trifosfato y se agitó durante 16-24 horas con nitrógeno. El 4-amino-desoxicitidina trifosfato-dPEG₈-hapteno se purificó mediante HPLC preparativa utilizando una columna Waters Sunfire OBD Preparative (10 [micro]m, C18, 50 x 250mm) y eluyendo con un gradiente de acetonitrilo:agua:0,8M carbonato de trietilamonio (1:83:16 a 25:59:16 durante 30min). Las fracciones puras fueron combinadas, liofilizadas y redisueltas en una cantidad mínima de agua DI. La solución de agua se pasó a través de una columna de intercambio de iones de sodio (SP Sephadex C-25, GE Lifesciences). La sal de sodio de 4-amino-desoxicitidina trifosfato-dPEG₈-hapteno se liofilizó a peso constante y se caracterizó mediante HPLC, ¹H/¹³C-NMR y MS.

15

Ejemplo 20

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento para generar un inmunógeno con una proteína vehículo inmunogénica y NHS-dPEG₈-hapteno. Una proteína vehículo inmunogénica liofilizada, como hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina bovina (BtG) o albúmina de suero bovino (BSA), se reconstituyó en 1,0 ml de PBS, pH 7.2, para obtener aproximadamente una solución de proteína de 10 mg/ml. El NHS-dPEG₈-hapteno (300 eq. para KLH, 150 eq. para BtG, o 60 eq. para BSA) se disolvió en 100 µL DMF, se añadió a la solución de proteína y se hizo rotar a temperatura ambiente hasta el día siguiente. La reacción se pasó por un filtro de jering GHP de 0,2 µm y se purificó mediante cromatografía SEC en un AKTA Purifier funcionando a 0,9 ml/min. en una columna GE Lifesciences Superdex 200 10/300 GL con PBS, pH 7.2. Se combinaron y recogieron las fracciones correspondientes a la proteína inmunogénica monomérica. La proteína etiquetada con hapteno se caracterizó mediante ensayo de proteína BCA (Pierce) para determinar la concentración de proteína y ensayo de lisina con fluorescamina (Bio-Tek) para determinar la carga de hapteno.

20

25

Ejemplo 21

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento para conjugar un anticuerpo primario con NHS-dPEG₈-hapteno. Un anticuerpo monoclonal o policlonal en PBS, pH 7.0-7.5, se trató con una solución de NHS-dPEG₈-hapteno (20 eq.) en DMSO anhidro para obtener una concentración de DMSO final no superior a 10% v/v. La reacción se hizo rotar 18 horas en un vial ámbar a temperatura ambiente y se filtró (filtro de jering GHP de 0,2 [micro]m) antes de la purificación mediante cromatografía SEC en un AKTA Purifier funcionando a 0,9 ml/min. en una columna GE Lifesciences Superdex 200 10/300 GL con PBS, pH 7.2. Los rendimientos típicos fueron del 70-80% con una cobertura de haptenos de 4-6 haptenos por anticuerpo.

30

35

Ejemplo 22

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento de conjugado de la región Fc de un anticuerpo primario con NHS-dPEG₈-hapteno. Un anticuerpo monoclonal o policlonal en PBS, pH 7.0-7.5, se trató con una solución acuosa no tampón de 100mM periodato de sodio para obtener una concentración final de 20mM periodato. La solución se hizo rotar a temperatura ambiente en un vial ámbar durante dos horas. El anticuerpo fue desalinizado y se realizó un intercambio de solución tampón pasando a través de una columna Sephadex G-25 (PD-10, GE Lifesciences) con ABS (0,1M acetato, 0,15M NaCl, pH 5.5). La solución de anticuerpo oxidada se hizo reaccionar con una solución acuosa no tamponada de hidrazida de poli(acrilamida) (50 eq) (más detalles sobre el uso de hidrazida de poli(acrilamida) se recogen en la solicitud copendiente del cesionario nº 60/931,546, presentada el 23 de mayo de 2007, y que queda incorporada al presente por referencia) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió cianoborohidruro (100 eq.) y se hizo rotar la reacción hasta el día siguiente. El conjugado PAH-Ab se purificó mediante cromatografía SEC en un AKTA Purifier funcionando a 0,9 ml/min. en una columna GE Lifesciences Superdex 200 10/300 GL con PBS, pH 7.2.

Ejemplo 23

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento para conjugar la región Fc de un anticuerpo primario con hidrazida-dPEG₈-hapteno. Un anticuerpo monoclonal o policlonal en PBS, pH 7.0-7.5, se trató con una solución acuosa no tampón de 100mM periodato de sodio para obtener una concentración final de 20mM periodato. La solución se hizo rotar a temperatura ambiente en un vial de ámbar durante dos horas. El anticuerpo fue desalinizado y se realizó un intercambio de solución tampón pasando a través de una columna Sephadex G-25 (PD-10, GE Lifesciences) con ABS (0,1M acetato, 0,15M NaCl, pH 5.5). La solución de anticuerpo oxidada se hizo reaccionar durante una hora a temperatura ambiente con una solución de hidrazida-dPEG-hapteno (20 eq.) en DMSO, de forma que la concentración final de DMSO no fuese superior a 10% v/v. Se añadió cianoborohidruro (100 eq.) y se hizo rotar la reacción hasta el día siguiente. El conjugado de Ab-dPEG₈-hapteno se purificó mediante cromatografía SEC en un AKTA Purifier funcionando a 0,9 ml/min. en una columna GE Lifesciences Superdex 200 10/300 GL con PBS, pH 7.2.

Ejemplo 24

El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento para conjugar un anticuerpo primario con maleimida-dPEG₈-hapteno. A una solución de anticuerpo monoclonal o policlonal en 100 mM fosfato, 1mM EDTA, solución tampón de pH 6.5 se añadió DTT a una concentración final de 25 mM. Esta mezcla se hizo rotar durante 25 minutos exactos, antes de desalinizar en Sephadex G25 (PD-10, GE Lifesciences) en 100mM fosfato, 1mM EDTA, solución tampón de pH 6.5. Se añadió maleimida-dPEG₈-hapteno (50 eq.) como solución DMF, de forma que la concentración final de DMF no superase el 10% v/v. La mezcla de la reacción se hizo rotar hasta el día siguiente en un vial ámbar en condiciones ambiente. El conjugado de Ab-dPEG₈-hapteno se purificó mediante cromatografía SEC en un AKTA Purifier funcionando a 0,9 ml/min. en una columna GE Lifesciences Superdex 200 10/300 GL con PBS, pH 7.5.

Ejemplo 25

Este ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento para conjugar ADN de cadena simple con carbodiimida-dPEG₈-hapteno. El ADN (100 µg) se colocó en solución tampón de TE a una concentración de 1 mg/ml en un tubo y se calentó hasta 98°C durante un minuto. La mezcla de la reacción se congeló en etanol-hielo seco y se añadieron 100 µL de 0.5 M solución tampón de borato de pH 9.5. La mezcla de la reacción se calentó hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añadió el EDC-dPEG₈-hapteno (100 µL de 1,0 mM en DMSO). La mezcla se incubó a 60 °C durante una hora, a continuación se añadió sal y se precipitó con isopropanol. El precipitado se lavó tres veces con EtOH al 80%.

Los resultados del etiquetado del ADN monocatenario con DNP-dPEG₈-EDC se proporcionan en las FIG. 17 y 18. La Fig. 17 indica que el porcentaje de etiquetado del nucleótido se incrementa, de forma sustancialmente lineal, a medida que aumenta el conjugado de hapteno. La Fig. 17 ilustra que el porcentaje de etiquetado del nucleótido se redujo al aumentar la concentración de solución de ADN.

Ejemplo 26

Este ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento de etiquetado del ADN con dCTP-amino-dPEG₈-hapteno. La incorporación de la etiqueta de hapteno al ADN se realizó mediante el procedimiento de traslación de mellas descrito por Rigby, PW; Dieckmann, M; Rhodes, C. y Berg, P., "Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I", J. Mol. Biol., V113:237-251, 1977 . La eficiencia del etiquetado fue del 2-6% basándose en la comparación de la absorbancia a 260nm de ADN y λ_{max} y ϵ (coeficiente de extinción) del

hapteno específico.

Ejemplo 27

5 El presente ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento de detección de hibridomas anti-hapteno. Se cubrieron microplacas con BSA-dPEG₈-benzofurazano (VMSI-1357-98). La solución tampón de dilución utilizada fue solución tampón de fosfatos (PBS) 0,15 molar. La concentración de BSA-dPEG₈-benzofurazano fue de 2 µg/ml, y la concentración por pocillo de 50 µL. Estas muestras se incubaron a 4 °C hasta el día siguiente. Se utilizó leche en polvo desnatada (NFDM) al 1% (10 mg/mL, 300 µL/por pocillo) como reactivo de bloqueo, seguido de incubación a 10 37 °C durante 120 minutos. Las placas se lavaron, cuando se consideró necesario, utilizando 0,15 M PBS que contenía un 0,05% de Tween 20. A continuación se utilizó cada hapteno testado para producir antisuero de ratón. Se utilizó una concentración total de 80 [micro]l por pocillo de antisuero de ratón diluido con un 1% de NFDM en 0,15 M PBAS, utilizando el protocolo de diluciones y de diseño de placas que se indica más adelante en la Tabla 6. Las placas se incubaron a continuación a 37 °C durante 150 minutos. Se utilizó un conjugado de peroxidasa de rábano-anticuerpo de cabra anti-ratón (Gt-α-Mu-HRP, Pierce) como anticuerpo secundario a una concentración de 1:10,000 en 0.15 M PBS con un 0,05% de Tween 20 para obtener un volumen total de 50 µL/por pocillo. A continuación, las 15 placas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. La configuración y los resultados del ELISA se resumen en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2

Resultados del ensayo ELISA

Adhesión:	Cliente					Muestra testada	Suero anti-ratón						
500421	Ventana												
Parámetros del ensayo													
Paso	Reactivo	Dilución en serie	Solución tampón de dilución	Concentración	Volumen/pocillo	Incubación							
Revestimiento de Ag.	VMSI-1357-98		0,15M PBS	2µg/ml	50µl	ON@4C							
Bloqueo	1% NFDM		0,15M PBS	10µg/ml	300 µl	2hr @37C							
Dilución de la muestra	Véase debajo	5 x	1% NFDM en 0,15m PBS	Partida @1,50	80 µl	2,5hr. @ 37C							
Ac secundario	Gt-α-Mu-HRP		,15M PBS w/0,05% Tween 20	1 (10000)	50µl	1hr @ 37c							
	Diseño de la placa												
Dilución de la muestra	1:50	1:250	1:1250	1:6250	1:31250	1:156250							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mu#1	A	1,89	0,01	1,81	0,00	1,82	0,00	1,60	0,00	1,06	0,00	0,56	0,00
Mu#2	B	1,76	0,01	1,87	0,00	1,73	0,00	1,25	0,00	0,60	0,00	0,25	0,00
Mu#3	C	1,70	0,01	1,83	0,00	1,87	0,00	1,50	0,00	0,95	0,01	0,37	0,00
Mu#4	D	1,75	0,01	1,73	0,00	1,83	0,00	1,49	0,01	0,98	0,00	0,42	0,00
Mu#5	E	1,62	0,01	1,58	0,00	1,72	0,00	1,35	0,00	,074	0,00	0,33	0,00
Concentrado	F	0,06	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

premezcla (PbP)													
			x		x		x		x			x	x
Antígeno	VMSI-1357-98 Lot#C05081610								x = en blanco (sin antígeno)				
Solución tampón de lavado	0,15M PBS con 0,05% Tween 20								NFDM = leche en polvo desnatada				
Ac secundario:	HRP-cabra- α -Fc de IgG mur específ. min. x-reac. #60312								Fecha de la muestra:	09/12/2005			
Sustrato	TMB lote #P502807								Fecha del ensayo:	09/12/2005			

Los resultados mostrados en la Tabla 2 indican que cada uno de los ratones sometidos a ensayo es adecuado para desencadenar una respuesta de anticuerpo, y también que estos haptenos se pueden visualizar para confirmar una respuesta. Con respecto al hapteno concreto testado, el ratón número 1 parece proporcionar la mejor respuesta de todas las diluciones testadas.

Ejemplo 28

Este ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento para conjugar anticuerpos anti-hapteno con peroxidasa de rábano (HRP). Las imágenes producidas utilizando estos conjugados se proporcionan en las Fig. 19-24.

Activación de HRP

A un vial ámbar de 4ml se añadieron 78,8 mg (100 eq.) de éster de MAL-dPEG₄TM NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH, F.W. = 513.50), seguidos de 2,46 ml (61,5 mg, 1,53 μ M) de HRP (Horseradish Peroxidase, Pierce, Rockford, IL Lot FJ925901) en forma de una solución de 25 mg / ml en 0,1 M fosfato sódico, pH 7.5. A continuación, el vial se colocó en un rotador de laboratorio en un lugar oscuro y a temperatura ambiente (23 - 25 °C), y se dejó progresar la reacción de formación de conector de amida durante una hora. A continuación, se retiró una parte alícuota de 400 μ l para la purificación y el resto de la solución se almacenó temporalmente a 4 °C. Se obtuvo maleimida-PEG4-HRP pura fraccionando la muestra en un AKTA Purifier equipado con una columna Superdex 10/300 (GE Lifesciences) y eluyendo con 0,1 M fosfato sódico, pH 7.5 a 1,0 ml / min. La HRP que contenía fracciones se agrupó para obtener 2,0 ml de una solución de 4,52 mg / ml de maleimida-PEG₄-HRP (90 % de recuperación), medida mediante espectrofotometría UV/VIS utilizando un coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1% (pH 6.5) de 6,52.

Introducción de tioles en anticuerpos

A un vial ámbar de 8 ml se añadieron 3,0 ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-hapteno en forma de una solución de 2,1 mg/ml en 0,1 M fosfato sódico, 1,0 mM EDTA, pH 6.5. A esta solución se añadieron 216 [micro]l de una solución 500 mM recién preparada del agente reductor DTT (1,4-Ditiotreitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El vial se colocó en un rotador de laboratorio en un lugar oscuro y se dejó progresar la reducción de disulfuro durante 25 minutos. La solución de la reacción se dividió en cuatro volúmenes iguales (debido a la capacidad limitada de la columna de desalinización empleada) y el DTT sobrante se retiró pasando cada una de las fracciones por una columna de desalinización PD-10 (GE Lifesciences) eluidas con 0,1 M fosfato sódico, 1,0 mM EDTA, pH 6.5. Las fracciones que contenían anticuerpo se combinaron para obtener 8,0 ml de una solución de 0,8 mg/ml de anticuerpo de ratón anti-hapteno reducido (71% de recuperación), medida mediante espectrofotometría UV/VIS utilizando un coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1% con pH 6.5 de 14.

Conjugación de anticuerpo-HRP

Al anticuerpo reducido (como anticuerpo monoclonal de ratón anti-nitropirazol) se añade un triple exceso molar de maleimida-PEG4-HRP. A continuación se incubó a temperatura ambiente (23 - 25 °C) durante 16 horas. Tras la purificación en una columna Superdex 200 10/300 GL SE, se obtiene un conjugado, típicamente con una media de 2 o 3 HRP por anticuerpo. El número de HRP por anticuerpo se determinó midiendo el ratio de absorbancias a 280 nm / 403 nm del conjugado. El conjugado se almacenó a continuación en una sala a 4 °C hasta su uso.

Ejemplo 29

Este ejemplo se refiere a un ejemplo de procedimiento para conjugar anticuerpos anti-hapteno con quantum dots (QD).

Reducción de disulfuros intercadenas en anticuerpos.

A una solución de anticuerpo monoclonal o policlonal en 100 mM fosfato, 1mM EDTA, solución tampón de pH 6.5 se añadió DTT a una concentración final de 25 mM. Esta mezcla se hizo rotar durante 25 minutos exactos, antes de desalinizar en Sephadex G25 (PD-10, GE Lifesciences) en 100mM fosfato, 1mM EDTA, solución tampón de pH 6.5.

Síntesis de QD-dPEG₁₂-MAL

A una solución de quantum dots (8-9 [micro]M en 50 mM solución tampón de borato, pH 8.0) se añadió NHS-dPEG₁₂-MAL (50 eq.) y se hizo rotar durante dos horas. Los quantum dots funcionalizados con maleimida (QD-dPEG₁₂-MAL) fueron purificados mediante desalinización en una columna Sephadex G25 (PD-10, GE Lifesciences) en 0.1 M solución tampón de fosfato, 0,1 M NaCl, pH 7.0.

Síntesis del conjugado anticuerpo-MAL-QD

La maleimida-QD purificada se combinó con el anticuerpo tiolado purificado en ratios molares de 4:1 anticuerpos frente a QD y se hizo rotar durante un periodo de 16 horas. El conjugado de anticuerpo-QD se purificó mediante cromatografía SEC en un Purificador AKTA funcionando a 0,9 ml/min en una columna Superdex 200 10/300 GL de GE Lifesciences con 50 mM solución tampón de borato, pH 8.0.

Ejemplo 30

El presente ejemplo demuestra la capacidad de visualizar los conjugados de anticuerpo primario-hapteno mediante inmunohistoquímica (IHC) cromogénica. Las tinciones representativas de este planteamiento se proporcionan en las Fig. 19-24. La Fig. 6 también es una tinción representativa de este planteamiento, donde los métodos para conjugar un anticuerpo primario con un hapteno se describen en los Ejemplos 21-24. La Fig. 7 es un control, donde el tejido es tratado con un anticuerpo diferente del anticuerpo anti-hapteno apropiado. La Fig. 7 establece la especificidad del método, dado que no se produce ninguna visualización a menos que se utilice el anticuerpo anti-hapteno adecuado.

Las secciones de tejido de amígdala fueron tratadas con un anticuerpo policlonal anti-lambda (Dako) conjugado con haptenos mediante el método de los Ejemplos 21, 22, 23 o 24. Los portaobjetos se desarrollaron utilizando protocolos estándar para la generación de señales HRP (mediante la adición de DAB) en un equipo de tñido (BenchMark® XT, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Un protocolo automático típico incluye desparafinación, varios pasos de enjuague, la adición de una solución tampón de reacción, la adición del anticuerpo primario (conjugado hapteno:anti-lambda), la adición del anticuerpo secundario (conjugado HRP: anti-hapteno), la adición de DAB y peróxido de hidrógeno, y la adición de un contratñido.

La puntuación manual fue realizada por patólogos certificados por el Comité. Se registraron las intensidades de tñición, el porcentaje de células reactivas y la localización celular. Para la intensidad de la tñición cualitativa, 0 es la puntuación más negativa y 3+ la más positiva. El patólogo revisó y puntuó los portaobjetos antes de la cuantificación mediante captura de imagen óptica.

Para la captura de imagen óptica, se utilizó una aplicación digital (VMSI) con cuantificación de la imagen basada en la intensidad (expresada como densidad óptica media u OD media) de la tñición convertida en una puntuación numérica. Se capturó una imagen de alta resolución para cada muestra y se determinó el valor de OD basándose en clasificadores específicos para la forma y la gama de color para las células teñidas positivamente. Se capturaron al menos tres áreas diferentes por muestra, utilizando lentes del objetivo de 20x o 40x. En algunos casos se obtuvo una "puntuación combinada" o un índice multiplicativo que incorpora tanto el porcentaje de células positivas como la intensidad de la tñición de acuerdo con la fórmula siguiente: Puntuación combinada = (% positivo) X (puntuación de densidad óptica).

Ejemplo 31

El presente ejemplo demuestra la capacidad para visualizar los conjugados de anticuerpo primario-hapteno mediante inmunohistoquímica (IHC) fluorescente (quantum dot).

Las secciones de tejido de amígdala se trataron con anticuerpo policlonal anti-kappa (Dako) conjugados con haptenos mediante el método de los Ejemplos 21, 22, 23 o 24. Los portaobjetos se desarrollaron utilizando un protocolo estándar para un equipo de tñido automático (BenchMark® XT, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Un protocolo automático típico es el siguiente: el tejido recubierto de parafina sobre el portaobjetos se calentó hasta 75°C durante 8 minutos y se trató dos veces con EZPrep (VMSI), el volumen se ajustó a 75°C antes de la aplicación de Liquid Cover Slip o LCS (VMSI). Tras dos periodos de incubación de 8 minutos a 75°C, se enjuagó el portaobjetos y se ajustó el volumen de EZPrep, seguido de LCS para desparafinar el tejido. El portaobjetos se enfrió a 37°C, se incubó durante 2 minutos y se enjuagó una vez con solución tampón de reacción (VMSI). El portaobjetos se trató con Cell Conditioner (VMSI) en dos ocasiones y se aplicó LCS. El portaobjetos se calentó a 95°C durante 8 minutos. A continuación se aplicó LCS, se calentó a 100°C durante 4 minutos y se aplicó nuevamente LCS. El proceso de incubación con Cell Conditioner consistente en Cell Conditioner, incubación durante 4 minutos y aplicación de LCS se repitió 9 veces a 100°C. El portaobjetos se enfrió durante 8 minutos, se enjuagó con Reaction

Buffer, se ajustó el volumen y se volvió a aplicar LCS. El portaobjetos se calentó a 37°C durante 2 minutos y se enjuagó dos veces antes de añadir el conjugado de anti-Kappa:hapteno (100 µl a 1,0 mg/ml), seguido de LCS e incubación a 37°C durante 32 minutos. El portaobjetos se enjuagó dos veces con Reaction Buffer. A continuación se aplicó LCS y se añadió el conjugado de Qdot:anti-hapteno (100 µl, 20-50 nmol) y se incubó a 37°C durante 32 minutos. El portaobjetos se enjuagó dos veces con solución tampón y, a continuación, se aplicó LCS. El portaobjetos se retiró del instrumento y se trató con un lavado con detergente antes de la aplicación manual de LCS. Los resultados se interpretaron utilizando un microscopio óptico y sirven de ayuda en el diagnóstico diferencial de procesos patofisiológicos, que pueden estar asociados o no con un antígeno concreto.

Ejemplo 32

El presente ejemplo demuestra la capacidad para visualizar el hapteno-ADN etiquetado mediante hibridación in situ (ISH) cromogénica. Los protocolos de hibridación in situ con plata o diaminobencidina (DAB) automatizada para la detección del número de copias del gen HER2 se desarrollaron en el instrumento Ventana Medical Systems Benchmark XT. La tinción se completa sobre el tejido integrado en parafina y fijado con formalina sobre portaobjetos de vidrio durante nueve horas. Los pasos del procedimiento son los siguientes: desparafinación, acondicionamiento celular utilizando proteasa 3 (VMSI), adición de la sonda de ADN (del Ejemplo 26) de HER2 etiquetada con hapteno, desnaturalización del tejido y la sonda, hibridación durante cuatro horas y detección con plata cromogénica catalizada por HRP. Concretamente, una sonda de HER2 etiquetada con nitropirazol se hibridó de una forma automatizada sobre tejido de mama fijado con formalina, seguido de detección con conjugado de anticuerpo anti-nitropirazol:HRP. La detección se puede realizar utilizando un kit de detección UltraView (Ventana Medical Systems) o mediante la deposición de plata utilizando el protocolo automatizado de HER2 SISH (Ventana Medical Systems). Los resultados se interpretaron utilizando un microscopio óptico y sirven de ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos patofisiológicos, que pueden estar asociados o no con un antígeno concreto.

Ejemplo 33

Este ejemplo demuestra la capacidad de visualizar el ADN etiquetado con hapteno mediante hibridación in situ (ISH) fluorescente (Quantum Dot). Los protocolos de hibridación in situ (vía Quantum Dots) fluorescente automatizados para la detección del número de copias del gen HER2 se desarrollaron en el instrumento Ventana Medical Systems Benchmark XT. La tinción se completa sobre el tejido integrado en parafina y fijado con formalina sobre portaobjetos de vidrio durante nueve horas. Los pasos del procedimiento son los siguientes: desparafinación, acondicionamiento celular utilizando proteasa 3 (VMSI), adición de la sonda de ADN (del Ejemplo 26) de HER2 etiquetada con hapteno, desnaturalización del tejido y la sonda, hibridación durante cuatro horas y detección con conjugados de anticuerpo anti-hapteno:Quantum Dot (del Ejemplo 29). Concretamente, se hibridó una sonda de HER2 etiquetada con benzofurazano de forma automatizada, seguida de detección con un conjugado de anticuerpo anti-benzofurazano-Quantum Dot 655. La captura de imágenes se realizó con un microscopio de fluorescencia Nikon.

Ejemplo 34

El presente ejemplo demuestra la capacidad para multiplexar conjugados de anticuerpo primario-hapteno y detectar mediante inmunohistoquímica (IHC) fluorescente (Quantum Dot) multiplexada. Este planteamiento se ilustra esquemáticamente en la Fig. 8. Las secciones de tejido de amígdala se trataron con una mezcla de conjugados de anticuerpo primario-hapteno: anticuerpo anti-CD20-biotina, anticuerpo anti-CD34-nitropirazol, anticuerpo anti-CD45-tiazolsulfonamida, anticuerpo anti-kappa-dinitrofenilo, anticuerpo anti-lambda-rotenona y anticuerpo anti-Ki67-benzofurazano. El conjugado anti-CD20-biotina se realizó acoplado los grupos funcionales tiol del anticuerpo a maleimida-dPEG 11-biotina utilizada 20 veces en exceso (tal como se describe en el Ejemplo 24). El conjugado anti-CD34-nitropirazol se formó mediante acoplamiento a la porción Fc del anticuerpo, utilizando hidrazida de poliacrilamida y 20 veces en exceso de NHS-dPEG8-NP (tal como se describe en el Ejemplo 22). Esto proporcionó 12 haptenos de nitropirazol por anticuerpo. El conjugado de anti-CD45-tiazolsulfonamida se realizó haciendo reaccionar las lisinas del anticuerpo con 20 veces en exceso de HS-dPEG8-TS (tal como se describe en el Ejemplo 21). Esto proporcionó 10 haptenos de tiazolsulfonamida por anticuerpo. El conjugado de kappa-dinitrofenilo se formó mediante acoplamiento a la porción Fc del anticuerpo utilizando hidrazida de poliacrilamida y 100 veces en exceso de NHS-dPEG8_DNP (tal como se describe en el Ejemplo 22). Esto proporcionó 62 haptenos de dinitrofenilo por anticuerpo. Tanto el conjugado de rotenona lambda como el conjugado de benzofurazano Ki67 se realizaron haciendo reaccionar las lisinas del anticuerpo con NHS-dPEG8-ROT y NHS-dPEG8-BF, respectivamente (tal como se describe en el Ejemplo 21). Esto proporcionó 0,3 haptenos de rotenona por anticuerpo y 2 haptenos de benzofurazano por anticuerpo. Las secciones de amígdala fueron tratadas a continuación con un cóctel de anticuerpos secundarios que se sintetizaron utilizando el procedimiento del Ejemplo 29: Gt α -biotina poliAc:QD 525 (300 nM); Ms α -NP mAc:QD 655 (50 nM); Ms α -TS mAc:QD 565 (300 nM); Rb [alfa]-DNP poliAB:QD 605 (100 nM); Ms α -ROT mAc:QD 705 (200 nM); y Ms α BF mAc:QD 585 (300 nM).

Microscopía de fluorescencia

La captura de imágenes se realizó con un microscopio de fluorescencia Nikon. La separación de los espectros de fluorescencia se consiguió utilizando una cámara CRi. Se utilizó DAPI para la contratinción para las secciones de amígdala multiplexadas.

5 La Fig. 37 es un compuesto de tinción multiplexada que se produjo utilizando una mezcla de conjugados de anticuerpo primario-hapteno y se visualizó secuencialmente con una mezcla de conjugados de anticuerpo anti-hapteno QDot, tal como se muestra en las Fig. 31-36 y en este Ejemplo 34.

10 Las Fig. 38-43 son imágenes extraídas de la tinción multiplexada de la Fig. 37. La Fig. 44 es un gráfico de la longitud de onda frente a la fluorescencia relativa que representa las longitudes de onda utilizadas para obtener señales de QDot individuales del compuesto de tinción multiplexada de la Fig. 37. La Fig. 44 establece también que la señal fluorescente es superior a la autofluorescencia nominal del tejido de amígdala.

VII. Composiciones que comprenden uno o más haptenos y/o conjugados de haptenos

15 Los conjugados divulgados en el presente pueden ser incluidos en composiciones de diagnóstico y/o farmacéuticas (incluyendo formulaciones terapéuticas y profilácticas), típicamente combinadas con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos (por ejemplo, antibióticos o antiinflamatorios).

20 Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar a sujetos mediante diversos métodos, como métodos de administración mucosa, incluyendo la vía oral, rectal, intranasal, intrapulmonar o transdérmica, o la vía tópica en otras superficies. Opcionalmente, el conjugado se puede administrar por vía no mucosa, incluyendo la vía intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraatrial, intraarticular, intraperitoneal o parenteral. En otras realizaciones alternativas, el conjugado se puede administrar ex vivo mediante exposición directa a las células, tejidos u órganos procedentes de un sujeto.

25 Para formular las composiciones farmacéuticas, el conjugado se puede combinar con diversos aditivos farmacéuticamente aceptables, así como una base o vehículo para la dispersión del conjugado. Los aditivos recomendados incluyen, a título meramente ilustrativo, agentes de control del pH, como arginina, hidróxido de sodio, glicina, ácido hidrocórico, ácido cítrico y similares. Por otra parte, se pueden incluir anestésicos locales (por ejemplo, alcohol bencílico), agentes isotonzantes (como cloruro sódico, manitol, sorbitol), inhibidores de la absorción (por ejemplo, Tween 80), agentes potenciadores de la solubilidad (como ciclodextrinas y derivados de las mismas), estabilizantes (por ejemplo, albúmina sérica) y agentes reductores (como glutatona). Las composiciones también pueden incluir adyuvantes, como hidróxido de aluminio (por ejemplo, Amphogel, Wyeth Laboratories, Madison, NJ), adyuvante de Freund, MPLTM (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; Corixa, Hamilton IN) e IL-12 (Genetics Institute, Cambridge MA), entre otros muchos adyuvantes apropiados conocidos en la técnica.

35 El conjugado se puede dispersar en una base o vehículo, que puede incluir un compuesto hidrófilo con capacidad de dispersar el conjugado y cualquier aditivo deseado. La base se puede seleccionar entre una gran variedad de compuestos adecuados, incluyendo, a título meramente enunciativo, copolímeros de ácidos policarboxílicos o sales de los mismos, anhídridos carboxílicos (por ejemplo, anhídrido maleico) con otros monómeros (por ejemplo, (met)acrilato de metilo, ácido acrílico y similares), polímeros de vinilo hidrófilo, como acetato de polivinilo, alcohol de polivinilo, polivinilpirrolidona, derivados de celulosa, como hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y similares, y polímeros naturales, como quitosán, colágeno, alginato de sodio, gelatina, ácido hialurónico y sales de metales no tóxicos de los mismos. A menudo, se selecciona un polímero biodegradable como una base o vehículo, por ejemplo, ácido poliláctico, copolímero de poli(ácido láctico-ácido glicólico), ácido polihidroxitúterico, copolímero de poli(ácido hidroxibutírico-ácido glicólico) y mezclas de los mismos. Alternativa o adicionalmente, los ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, etc., se pueden utilizar como vehículos. Los polímeros hidrófilos y otros vehículos se pueden utilizar solos o combinados y se puede transmitir una mayor integridad estructural al vehículo mediante cristalización parcial, enlace iónico, reticulación y similares. El vehículo se puede disponer en una variedad de formas, que incluyen fluido o soluciones viscosas, geles, pastas, polvos, microesferas y películas para la aplicación directa una superficie mucosa.

45 El conjugado se puede combinar con la base o el vehículo utilizando diversos métodos y la liberación del conjugado se puede dar por difusión, desintegración del vehículo o formación asociada de canales de agua. En algunas circunstancias, el conjugado se dispersa en microcápsulas (microesferas) o nanocápsulas (nanoesferas) preparadas a partir de un polímero adecuado, por ejemplo, 2-cianoacrilato de isobutilo (véase, por ejemplo, Michael et. al., J. Pharmacy Pharmacol. 43:1-5, 1991), y se dispersa en un medio dispersante biocompatible, lo cual produce una liberación sostenida y actividad biológica durante un tiempo prolongado.

55 Las composiciones de la divulgación pueden contener alternativamente como vehículos farmacéuticamente aceptables sustancias necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes ajustadores del pH y agentes tamponadores, agentes para el ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán y oleato de trietanolamina. Para composiciones sólidas, se pueden utilizar vehículos farmacéuticamente

aceptables no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

5 Las composiciones terapéuticas para la administración del conjugado también se pueden formular como una solución, microemulsión u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de ingredientes
 10 activos. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada para las soluciones se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula deseado en el caso de formulaciones dispersables, y con el uso de tensioactivos. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares,
 15 polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada del conjugado se puede ocasionar mediante la inclusión en la composición de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

15 En ciertas realizaciones de la invención, el conjugado se puede administrar en una formulación de liberación con el tiempo, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Estas composiciones se pueden preparar con vehículos que protegerán contra la liberación rápida, por ejemplo, un vehículo de liberación controlada, tal como un polímero, sistema de liberación microencapsulado o gel bioadhesivo. La liberación prolongada en varias composiciones de la divulgación se puede ocasionar mediante la inclusión en la composición de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina. Cuando se
 20 desean formulaciones de liberación controlada, los aglutinantes de liberación controlada adecuados para la presente divulgación incluyen cualquier material de liberación controlada biocompatible que sea inerte al agente activo y capaz de incorporar el conjugado y/u otro agente biológicamente activo. En la técnica se conocen numerosos materiales de este tipo. Los aglutinantes de liberación controlada útiles son materiales que se metabolizan lentamente bajo condiciones fisiológicas tras la administración (por ejemplo, en la superficie mucosa, o en presencia de fluidos corporales). Entre los aglutinantes apropiados se incluyen, a título meramente enunciativo, polímeros
 25 biocompatibles y copolímeros conocidos en la técnica para su uso en formulaciones de liberación sostenida. Estos compuestos biocompatibles no son tóxicos y son inertes a los tejidos circundantes y no desencadenan efectos secundarios adversos significativos, tales como irritación nasal, respuesta inmune, inflamación o similares. Se metabolizan en productos metabólicos que también son biocompatibles y fácilmente eliminados del organismo.

30 Entre los materiales poliméricos de ejemplo para su uso en la presente divulgación se incluyen, a título meramente enunciativo, matrices poliméricas derivadas de poliésteres copoliméricos y homopoliméricos que tienen uniones de éster hidrolizables. Varios de ellos son conocidos en la técnica por ser biodegradables y por conducir a productos de degradación que no tienen toxicidad o tienen toxicidad baja. Entre los ejemplos de polímeros se incluyen ácidos poliglicólicos y ácidos polilácticos, poli(ácido DL-láctico-ácido coglicólico), poli(ácido D-láctico-ácido coglicólico) y poli(ácido L-láctico-ácido coglicólico). Otros polímeros biodegradables o bioerosionables útiles incluyen, a título
 35 meramente enunciativo, polímeros tales como poli(epsilon-caprolactona), poli(epsilon-aprolactona-CO-ácido láctico), poli(epsilon-aprolactona-CO-ácido glicólico), poli(ácido beta-hidroxi butírico), poli(alquil-2-cianoacrilato), hidrogeles, tales como poli(hidroxietil metacrilato), poliamidas, poli(aminoácidos) (por ejemplo, L-leucina, ácido glutámico, ácido L-aspartico y similares), poli(éster urea), poli(2-hidroxietil DL-aspartamida), polímeros de poliacetales, poliortoésteres, policarbonato, polimaleamidas, polisacáridos y copolímeros de los mismos. Muchos métodos para
 40 preparar dichas formulaciones son conocidos en general por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978). Otras formulaciones útiles incluyen microcápsulas de liberación controlada (Patentes estadounidenses n° 4.652.441 y 4.917.893, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico útiles en la fabricación de microcápsulas y otras formulaciones (Patentes estadounidenses n° 4.677.191 y 4.728.721) y composiciones de liberación sostenida para péptidos solubles en agua (Patente estadounidense n° 4.675.189).

45 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación son típicamente estériles y estables en condiciones de fabricación, almacenamiento y uso. Se pueden preparar soluciones estériles mediante la incorporación del conjugado en la cantidad requerida en un solvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes indicados en el presente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan
 50 mediante la incorporación del conjugado y/u otro agente biológicamente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los indicados en el presente. En el caso de polvos estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización que produce un polvo del conjugado más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por
 55 ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.

60 De acuerdo con los diversos métodos de tratamiento de la divulgación, el conjugado se puede administrar a un sujeto de manera coherente con las metodologías convencionales asociadas con el tratamiento del trastorno que se pretende tratar o prevenir. De acuerdo con la divulgación del presente, se administra una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva del conjugado y/u otro agente biológicamente activo a un sujeto que necesita ese tratamiento durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para prevenir, inhibir y/o mejorar una enfermedad seleccionada (por ejemplo, antrax) o una condición o uno o más síntomas de la misma.

VIII. Desarrollo del fármaco y realizaciones de la terapia con el fármaco

5 Las realizaciones divulgadas de los haptenos, conjugados de haptenos y composiciones de los mismos pueden ser utilizados como reactivos útiles para la identificación y detección de la expresión o activación de marcadores biológicos asociados con enfermedades, la eficacia terapéutica, la tumorigénesis en muestras de células y tejidos de pacientes con cáncer, etc. Los métodos divulgados en el presente resultan útiles para predecir o valorar la respuesta de un paciente dado a un régimen de tratamiento concreto. Estas realizaciones se ejemplificarán particularmente en el presente con referencia al cáncer y al tratamiento del cáncer, aunque un experto en la técnica apreciará que el ámbito de aplicación de la invención no se limita al diagnóstico y tratamiento del cáncer, sino que se puede aplicar a otras enfermedades, desarrollo de fármacos y terapias con fármacos.

10 Una realización del método consiste en seleccionar primero un agente terapéutico. Se conjuga al menos un hapteno con el fármaco, que posteriormente es administrado a un sujeto. La distribución del fármaco, la producción del metabolito, etc., se puede controlar después mediante un seguimiento del conjugado del hapteno-agente terapéutico, por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-hapteno que tiene una etiqueta detectable.

15 Una realización del método implica la identificación de un tumor de mamífero sometiendo a ensayo una muestra obtenida de un tumor de mamífero. Por ejemplo, la muestra se puede someter a ensayo para detectar inhibidores de una vía, como el inhibidor de la vía de mTOR, el inhibidor de la vía de EGF o un inhibidor doble. El método puede consistir en someter a ensayo una muestra obtenida del mamífero para detectar genes que se están expresando o sobreexpresando, proteínas producidas por estos genes, patrones de expresiones, procesos celulares, como fosforilación, o combinaciones de los mismos. "Célula o muestra de tejido" para los fines del presente contexto significa muestras biológicas que contienen células, a menudo células tumorales, que son aisladas de muestras del organismo, tales como, a título meramente enunciativo, frotis, esputos, biopsias, secreciones, líquido cefalorraquídeo, bilis, sangre, líquido linfático, orina y heces, o tejido que ha sido extraído de órganos, como tejido de mama, pulmón, intestino, piel, cuello uterino, próstata y estómago. Por ejemplo, las muestras de tejido pueden comprender una región de células adyacentes o funcionalmente relacionadas.

20 Para el ejemplo de realización relativa al cáncer de mamífero, se pueden utilizar los patrones de expresión, la fosforilación, o ambas cosas. Por ejemplo, las realizaciones divulgadas de la presente divulgación se pueden utilizar para analizar un grupo de dos o más polipéptidos consistentes en:
 25 (a) al menos un polipéptido de la vía EGF, y
 30 (b) al menos un anticuerpo de la vía mTOR.

Un patrón detectado de expresión, fosforilación o tanto expresión como fosforilación identifica los tumores de mamífero que precisan una doble terapia de inhibidor de la vía mTOR e inhibidor de la vía EGF. En determinadas realizaciones, al menos un polipéptido de la vía EGF incluye el polipéptido de ERK fosforilado; el polipéptido de MEK fosforilado; o tanto el polipéptido de ERK fosforilado como el polipéptido de MEK fosforilado. En otras realizaciones, al menos un polipéptido de la vía mTOR comprende el polipéptido de HIF-1 α , el polipéptido de mTOR, o tanto el polipéptido de HIF-1 α como el polipéptido de mTOR.

35 En determinadas realizaciones, los patrones de expresión, las proteínas expresadas, los procesos celulares, como la fosforilación, y las combinaciones de los mismos se pueden determinar en un control. Los patrones y/o productos detectados se pueden comparar con los del paciente. Por ejemplo, un patrón de expresión, fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación detectados en el grupo de polipéptidos se comparan con el patrón de expresión, fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación del grupo de polipéptidos de un control. Unos niveles incrementados del grupo de polipéptidos de la muestra en comparación con los niveles del grupo de polipéptidos de control indica que el tumor de mamífero necesita una doble terapia con inhibidor de la vía mTOR y terapia con inhibidor de la vía EGF.

40 Determinadas realizaciones de la presente divulgación proporcionan métodos para predecir la respuesta de los pacientes a una pauta de tratamiento, como la de los sujetos con cáncer a la terapia contra el cáncer. Se pueden identificar biomarcadores predictivos en pacientes para los que la administración de un agente terapéutico concreto será sumamente efectiva, incluyendo una doble terapia de inhibidor. Por ejemplo, los biomarcadores predictivos se pueden identificar para evaluar o controlar la eficacia de la doble terapia con agentes terapéuticos dirigidos hacia miembros de la vía EGF o de la vía mTOR.

45 La oportuna identificación de los pacientes que no responden a una pauta de tratamiento permite a los médicos limitar la exposición de un paciente con cáncer a efectos secundarios innecesarios del tratamiento y establecer tratamientos alternativos. Lamentablemente, los métodos existentes en la técnica, incluyendo la exploración histológica, son insuficientes para esta identificación oportuna y precisa. La presente divulgación proporciona realizaciones de un método para desarrollar pautas de tratamiento más informadas y efectivas que se pueden administrar a los pacientes con mayores probabilidades de un resultado efectivo (es decir, la reducción o eliminación del tumor).

Un diagnóstico, tanto el diagnóstico inicial de la enfermedad como el posterior control de su evolución (antes, durante o después del tratamiento), a menudo se confirma utilizando una exploración histológica de muestras de células o tejidos obtenidos de un paciente. En el caso de los tumores, los patólogos clínicos deben ser capaces de determinar de forma precisa si estas muestras son benignas o malignas y de clasificar la agresividad de las muestras de los tumores que se consideran malignos. Estas determinaciones suelen sentar la base para la selección de un tratamiento adecuado para el paciente. De forma similar, los patólogos deben ser capaces de detectar hasta qué punto un cáncer ha evolucionado o remitido, en particular como resultado del tratamiento, más concretamente del tratamiento con agentes quimioterapéuticos o biológicos.

La exploración histológica implica procedimientos de tinción de tejidos, tal como se divulga en el presente o en combinación con otras tecnologías conocidas que permiten observar fácilmente las características morfológicas de una muestra, por ejemplo, bajo un microscopio óptico. Un patólogo, tras examinar la muestra teñida, típicamente realiza una determinación cualitativa acerca de si la muestra de tumor es o no maligna. Averiguar la agresividad de un tumor simplemente mediante una exploración histológica resulta difícil. La agresividad de un tumor suele ser resultado de la bioquímica de las células que lo componen, tales como la expresión de proteína, la supresión y fosforilación de proteína, que se puede reflejar o no en la morfología de la muestra. Evaluar la bioquímica de las células de una muestra de tumor utilizando únicamente las realizaciones divulgadas de la presente invención y, opcionalmente, en combinación con otras técnicas conocidas es recomendable, como lo es la observación y potencialmente la cuantificación, tanto de la expresión genética como de la fosforilación de proteína de los genes o proteínas relacionados con el tumor o, más concretamente, de los componentes celulares de las vías de señalización relacionadas con el tumor.

La terapia contra el cáncer se puede basar en los perfiles moleculares de los tumores y no simplemente en su histología o en la localización de la enfermedad. Determinar los efectos biológicos de las terapias seleccionadas sobre el tejido del tumor y correlacionar estos efectos con la respuesta clínica ayuda a identificar las principales vías de crecimiento y supervivencia operativa en los tumores, estableciendo así un patrón de los probables pacientes respondedores y proporcionando, al mismo tiempo, una base lógica para el diseño de estrategias orientadas a superar la resistencia. Dirigir el diagnóstico al receptor del factor de crecimiento adecuado permite determinar si el crecimiento o la supervivencia del tumor está siendo propiciado por el receptor o la familia de receptores diana, por otros receptores a los que no va dirigida la terapia, y si las señales posteriores sugieren que hay otras vías oncogénicas implicadas. Por otra parte, cuando hay más de una vía de señalización implicada, los miembros de esas vías de señalización se pueden utilizar como dianas de diagnóstico para determinar si una doble terapia inhibidora es o será efectiva.

Las medicaciones quimioterapéuticas efectivas destruyen las células tumorales y no las células normales adyacentes. Esto se consigue utilizando medicaciones que afectan a las actividades celulares que se producen predominantemente en las células cancerígenas pero no en las células normales. Una diferencia entre las células normales y tumorales es la cantidad de oxígeno en las células. Muchas células tumorales son "hipóxicas", es decir, presentan una deficiencia de oxígeno.

Las células de mamífero presentan múltiples respuestas para equilibrar la necesidad de oxígeno como un sustrato de energía y el riesgo inherente de daño oxidativo a las macromoléculas celulares. Se han identificado las bases moleculares de diversos mecanismos celulares y sistémicos de homeostasis de oxígeno, y se ha descubierto que los mecanismos se encuentran presentes en todos los niveles de regulación, incluyendo la transcripción genética, la traslación de proteínas, la modificación postraslacional y la localización celular (Harris, 2002, Nat Rev. 2:38-47).

Las realizaciones de la presente invención se pueden utilizar para analizar estos productos y/o procesos. Una realización divulgada consiste, en primer lugar, en la identificación de los tumores. Un conjunto de pruebas de diagnóstico para tumores se utiliza para encontrar el candidato adecuado, preferiblemente el óptimo, para cada terapia. Por ejemplo, el tratamiento con una terapia dirigida a la vía mTOR, como rapamicina o PX-478, puede no resultar efectiva a menos que se use en combinación con un inhibidor de la vía EGF. Cuando hay unos elevados niveles de expresión de los componentes de la vía EGF, como pERK y pMEK, una terapia dirigida a la vía mTOR no resultará efectiva. Las realizaciones divulgadas de la presente invención ayudan al médico a identificar la combinación más efectiva de terapias dirigidas.

Los sistemas de análisis de imágenes automatizados (asistidos por ordenador) conocidos en la técnica pueden aumentar el examen visual de las muestras tumorales. En una realización representativa, una muestra de células o tejido está expuesta al menos a un hapteno o conjugado de haptenos divulgado, como un conjugado de hapteno-anticuerpo, o una composición de los mismos, que tiene una etiqueta detectable o que es reconocido por un anticuerpo anti-hapteno que tiene una etiqueta detectable. Estos procesos y reactivos basados en haptenos pueden ser específicos para un marcador biológico concreto, como los divulgados en el presente. Una imagen, típicamente una imagen ampliada, de la muestra se procesa, a continuación, a través de un ordenador que recibe la imagen, típicamente de un dispositivo de carga acoplada (CCD) o cámara, como una cámara de televisión. Este sistema se puede utilizar, por ejemplo, para detectar y medir la expresión y los niveles de activación de las dianas deseadas, tales como HIF-1 α , pMEK, pERK, mTOR, pmTOR, pAKT, pTSC2, pS6, y p4EBP1 en una muestra, o cualquier otro biomarcador de diagnóstico adicional. De este modo, las realizaciones divulgadas de la presente divulgación

proporcionan un diagnóstico del cáncer más preciso y una mejor caracterización de la expresión genética en las células cancerígenas histológicamente identificadas, más concretamente por lo que respecta a la expresión de genes marcadores de tumores o genes que se sabe que se expresan en determinados tipos y subtipos de cáncer (por ejemplo, que presentan diferentes grados de malignidad). Esta información permite al médico determinar la pauta de tratamiento más efectiva y controlar los resultados de una pauta de tratamiento aplicada. Por ejemplo, los fármacos con eficacia clínica para determinados tipos o subtipos de tumores se pueden administrar a pacientes cuyas células son identificadas de este modo.

Otro inconveniente de las terapias convencionales es que la eficacia de agentes terapéuticos específicos para el tratamiento de una enfermedad concreta en un paciente humano individual es impredecible. Esta impredecibilidad ha impedido en gran medida hasta la fecha determinar, antes de comenzar la terapia, si uno o más agentes seleccionados serían activos o permitirían un pronóstico o pauta de tratamiento adecuada en un paciente individual. Esto resulta especialmente importante porque una enfermedad concreta presenta al médico la opción de elegir entre diversas pautas de tratamiento, sin que en la actualidad disponga de ninguna manera de averiguar qué régimen será el más eficaz para un individuo concreto. Las realizaciones divulgadas de la presente divulgación permiten evaluar mejor la eficacia prevista de un agente terapéutico propuesto (o de una combinación de agentes) para un paciente individual. Las realizaciones divulgadas también son beneficiosas por otras razones, como que permiten evaluar de forma rápida y económica la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos y que son mínimamente traumáticas para los pacientes con cáncer.

Como resultado, las realizaciones divulgadas del presente método se pueden utilizar para identificar una enfermedad que responderá al tratamiento propuesto, como un tumor de mamífero que responde a un inhibidor concreto, como un inhibidor de la vía mTOR, o una doble terapia de inhibidor de la vía mTOR e inhibidor de la vía EGF. Por otra parte, las realizaciones divulgadas de la divulgación se pueden utilizar para seleccionar un paciente para un tratamiento concreto o se pueden utilizar para identificar una enfermedad que no responde a las terapias dirigidas. Asimismo, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para seleccionar un sujeto que probablemente no responderá a un tratamiento propuesto.

Los patrones de expresión, u otros procesos celulares, como la fosforilación, los productos celulares, etc., se detectan y, opcionalmente, se cuantifican utilizando realizaciones divulgadas de la presente divulgación. Por ejemplo, los patrones de expresión y/o fosforilación de los polipéptidos se pueden detectar utilizando reactivos de biodetección específicos para los polipéptidos. Entre los ejemplos de reactivos de biodetección se incluyen anticuerpos y sondas de ácido nucleico, típicamente una colección de uno o más fragmentos de ácido nucleico cuya hibridación con una muestra se puede detectar. El anticuerpo y la sonda pueden estar sin etiquetar o etiquetados, de forma que su unión con la diana o muestra se pueda detectar. Por ejemplo, el anticuerpo o la sonda se podría conjugar con al menos un hapteno divulgado, solo o en combinación con otros haptenos divulgados o conocidos. Se puede administrar a una muestra un anticuerpo anti-hapteno que tiene una etiqueta detectable de forma efectiva para permitir que el anticuerpo anti-hapteno forme un complejo con el hapteno. A continuación, se puede visualizar el complejo.

Las sondas de ácido nucleico pueden ser de una fuente de ácidos nucleicos de una o más porciones (preseleccionadas) concretas del genoma, por ejemplo uno o más clones, un fragmento de cromosoma o cromosoma completo aislado, o una serie de productos de la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La sonda de ácido nucleico también pueden ser ácidos nucleicos aislados inmovilizados sobre una superficie sólida (como nitrocelulosa, vidrio, cuarzo, portaobjetos de sílice fundida), como en un conjunto. La sonda puede ser un miembro de un conjunto de ácidos nucleicos como los descritos, por ejemplo, en WO 96/17958. Las técnicas capaces de producir conjuntos de alta densidad también se pueden utilizar para este fin (véase, por ejemplo, Fodor (1991) Science 767-773 ; Johnston (1998) Curr. Biol. 8: R171-R174 ; Schummer (1997) Biotechniques 23: 1087-1092 ; Kern (1997) Biotechniques 23: 120-124 ; Patente estadounidense n° 5.143.854).

Un experto en la técnica reconocerá que la secuencia precisa de las sondas concretas se puede modificar en cierto grado para producir sondas que sean "sustancialmente idénticas", pero que conserven la capacidad de unirse de forma específica (es decir, hibridarse de forma específica) con las mismas dianas o muestras que la sonda de la que proceden. El término "ácido nucleico" se refiere a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de cadena simple o doble. El término incluye los ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos similares que presentan unas propiedades de unión similares o mejoradas para el propósito deseado, como el ácido nucleico de referencia. El término incluye asimismo ácidos nucleicos que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturalmente presentes o de manera mejorada para los fines perseguidos. El término incluye también estructuras similares a los ácidos nucleicos con estructuras sintéticas. Un experto en la técnica reconocerá cómo utilizar las sondas de ácido nucleico para detectar células cancerígenas en una muestra consultando, por ejemplo, la Patente estadounidense 6.326.148, sobre la detección de células del carcinoma de colon.

Los polipéptidos asociados con el cáncer se pueden cuantificar mediante análisis de imágenes, utilizando un anticuerpo primario adecuado contra los biomarcadores, incluyendo, a título meramente enunciativo, HIF-1 α , pMEK, pERK, mTOR, pmTOR, pAKT, pTSC2, pS6, y p4EBP1, detectados directamente o utilizando un anticuerpo

secundario apropiado (como IgG de conejo anti-ratón, cuando se utilizan anticuerpos primarios de ratón) y/o un complejo de biotina y avidina terciaria (o estreptavidina) ("ABC").

5 Algunos ejemplos de reactivos útiles para la práctica de los métodos de la invención ejemplificados en el presente incluyen anticuerpos específicos para HIF-1 α , incluyendo, a título meramente enunciativo, el anticuerpo monoclonal de ratón VMSI 760-4285, obtenido de Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ). Otros reactivos útiles en la práctica de los métodos de la presente invención incluyen, a título meramente enunciativo, anticuerpo policlonal de conejo Abcam 2732 específico para mTOR, anticuerpo policlonal de conejo CST 2971 específico para pmTOR, anticuerpo policlonal de conejo CST 3614 específico para mTSC2, anticuerpo policlonal de conejo CST 2211 específico para pS6, anticuerpo monoclonal de conejo CST 3787 específico para pAKT, anticuerpo policlonal de conejo CST 9121 específico para pMEK, anticuerpo policlonal de conejo VMSI 760-4228 específico para mERK (p44/p42), y anticuerpo policlonal de conejo CST 9455 específico para m4EBP1.

10 Por otra parte, se pueden comparar patrones o productos predictivos, como los péptidos o la fosforilación de los mismos, con una muestra que no ha recibido tratamiento, como una muestra de células o tejido no tumoral. La muestra de células o tejido no tumoral se puede obtener de una muestra de células o tejido no tumoral del mismo individuo o, alternativamente, de un individuo diferente. Un patrón detectado de un polipéptido se considera reducido en la muestra de células o tejido tumoral de mamífero, si se detecta menos polipéptido en comparación con la muestra de células o tejido no tumoral. Un patrón detectado de un polipéptido se considera aumentado en la muestra de células o tejido tumoral de mamífero, si se detecta más polipéptido en comparación con la muestra de células o tejido no tumoral. Un patrón detectado de un polipéptido se considera normal en la muestra de células o tejido tumoral de mamífero, si se detecta una cantidad igual o aproximadamente igual en comparación con la muestra de células o tejido no tumoral.

15 Las cantidades de proteína diana se pueden cuantificar midiendo la densidad óptica media de los antígenos teñidos. Al mismo tiempo, la proporción o el porcentaje de superficie total de tejido teñida se puede calcular fácilmente, por ejemplo como la superficie teñida por encima de un nivel de control (como un nivel máximo de anticuerpo) en la segunda imagen. Tras la visualización de los núcleos que contienen biomarcadores, el porcentaje o la cantidad de estas células en el tejido obtenido de pacientes tras el tratamiento se comparan con el porcentaje o la cantidad de estas células en el tejido sin tratar. Para los fines de la presente invención, en general se entenderá por "determinar" un patrón de expresión, fosforilación, o tanto expresión como fosforilación de polipéptidos simplemente obtener información sobre el nivel de expresión de este polipéptido o polipéptidos, sea mediante su examen directo o indirectamente, por ejemplo, a través de un servicio de diagnóstico contratado.

IX. Utilidades diversas

20 A pesar de que los ejemplos presentados en el presente para ejemplificar la invención se refieren principalmente a ensayos inmunohistoquímicos, los haptenos divulgados, las sondas etiquetadas con haptenos divulgadas y los métodos de detección divulgados se pueden aplicar a cualquier tipo de inmunoensayo, ensayo basado en ácido nucleico o ensayo basado en PNA (ácido nucleico peptídico). Por ejemplo, los haptenos divulgados pueden formar una componente detectable mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA); ensayos de microarrays de proteína, ácido nucleico y PNA; y ensayos de citometría de flujo. Por otra parte, los ensayos inmunohistoquímicos como los detallados específicamente en el presente también se pueden aplicar para la detección de moléculas diana en matrices de tejido.

25 Los haptenos, anticuerpos conjugados con haptenos y métodos de detección divulgados se pueden utilizar para la detección de moléculas diana en ensayos ELISA de formato competitivo, tipo sandwich y estándar (indirecto). En un ELISA de formato estándar, las moléculas diana se adhieren de forma no específica a un sustrato (como sustrato de nitrocelulosa) y son posteriormente detectadas mediante uno o más anticuerpos primarios que se unen específicamente a la diana o dianas deseadas. En una realización, los anticuerpos primarios se etiquetan con diferentes haptenos como los divulgados en el presente, y posteriormente se añaden los anticuerpos anti-hapteno conjugados con etiquetas detectables (más concretamente, enzimas en un ensayo ELISA, aunque se podrían sustituir por otras etiquetas detectables como quantum dots) divulgados para visualizar la presencia de moléculas diana adheridas al sustrato. Alternativamente, en el formato sandwich, los anticuerpos de captura específicos para una o más moléculas diana se adhieren (de forma covalente o no covalente) a un sustrato y se añade una muestra, permitiendo que las moléculas diana presentes también se adhieran al sustrato mediante la interacción con los anticuerpos de captura. Tras el lavado para retirar las moléculas no diana que no se unen específicamente al sustrato, se añaden uno o más anticuerpos de detección que se unen a las dianas deseadas en un sitio diferente de los anticuerpos de captura. En una realización, el anticuerpo o los anticuerpos de detección son etiquetados con uno o más haptenos divulgados y, a continuación, se añaden uno o más anticuerpos anti-hapteno divulgados conjugados con la misma etiqueta detectable o con una diferente para la posterior visualización de las dianas adheridas al sustrato. En cualquier formato, la amplificación de la señal de visualización resulta posible utilizando otros anticuerpos intermedios como anti-anticuerpos específicos para una especie.

5 En otras realizaciones, los haptenos divulgados, los anticuerpos etiquetados con haptenos divulgados y los ácidos nucleicos etiquetados divulgados, así como los métodos de detección divulgados, se pueden emplear para la detección de una diana en inmunoblots, donde las proteínas o ácidos nucleicos separados por electroforesis se transfieren de forma no específica a un sustrato, en el que posteriormente se analiza la presencia de las proteínas o secuencias de ácido nucleico concretas. Por ejemplo, en un ensayo Southern Blot, los ácidos nucleicos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfieren desde el gel en una posición relativa entre sí a un filtro de nitrocelulosa. A continuación, el filtro se somete a sondas de ácido nucleico etiquetadas con hapteno que se pueden detectar utilizando anticuerpos anti-hapteno divulgados conjugados con etiquetas detectables. La detección de dianas en Northern blots (ARN) y Western blots (proteínas) también resulta posible utilizando los haptenos divulgados.

15 Los haptenos divulgados, sondas etiquetadas con hapteno y métodos de detección también se pueden utilizar en protocolos de detección de dianas utilizando microarrays, como microarrays de proteína normales o de fase reversa y microarrays de ácido nucleico (incluyendo microarrays de oligonucleótidos y ADNc). Por ejemplo, en un microarray de proteína de fase reversa, las muestras se transfieren individualmente sobre un sustrato en el que las proteínas de las muestras se unen de forma no específica al sustrato. Posteriormente, se utilizan múltiples anticuerpos diferentes (como los conjugados de anticuerpo-hapteno divulgados) para someter las manchas a una sonda y detectar la presencia de proteínas concretas. Cada mancha se puede someter a una sonda para detectar una pluralidad de proteínas diferentes de forma simultánea o, alternativamente, cada mancha se puede someter a una sonda para detectar una proteína diferente o se puede someter cada mancha a una sonda para detectar la misma proteína (como cuando cada mancha es de una muestra diferente tomada de un sujeto en momentos diferentes, por ejemplo, tras la administración de un fármaco al sujeto). En el caso de los microarrays de ácido nucleico, se pueden utilizar las sondas etiquetadas con hapteno divulgadas en un protocolo de detección.

25 Los microarrays de tejido se utilizan de forma beneficiosa para implementar realizaciones divulgadas de la invención, para analizar rápidamente múltiples muestras de tejido en condiciones de tinción y puntuación uniformes. (Hoos et al., 2001, Am J Pathol. 158: 1245-51). La puntuación de las matrices teñidas se puede realizar manualmente, utilizando la escala estándar de 0 a 3+, o mediante un sistema automático que cuantifica de forma precisa la tinción observada. Por ejemplo, con realizaciones de la terapia con fármacos divulgadas, este análisis se puede utilizar para identificar biomarcadores que predicen mejor los resultados del paciente tras el tratamiento. Se puede predecir una "probabilidad de respuesta" del paciente que va del 0 al 100 por cien, basándose en la expresión, en la fosforilación, o en ambas, de un pequeño conjunto de ligandos, receptores, proteínas de señalización o combinaciones predictivas de los mismos. Se pueden analizar muestras adicionales de pacientes con cáncer, sea como alternativa o adicionalmente a los resultados de los microarrays de tejidos. Por ejemplo, el análisis de muestras de pacientes con cáncer de mama puede confirmar las conclusiones de las matrices de tejido, si las respuestas del paciente están correlacionadas con un patrón específico de expresión del receptor y/o de señalización posterior.

35 Los haptenos, las sondas etiquetadas con hapteno y los métodos de detección divulgados también resultan útiles en la citometría de flujo, donde las células se someten a una sonda para detectar la presencia de una o más moléculas diana (por ejemplo, proteínas o secuencias de ácido nucleico concretas) y posiblemente se clasifican en función de la presencia o ausencia de una o más moléculas diana (como la clasificación celular activada por fluorescencia, FACS). En una realización, uno o más de los anticuerpos etiquetados con haptenos o sondas de ácido nucleico etiquetadas con haptenos divulgados se ponen en contacto con una pluralidad de células y, a continuación, las células se ponen en contacto con uno o más anticuerpos anti-hapteno que se conjugan con una o más etiquetas diferencialmente detectables.

X. Información general sobre el reconocimiento del antígeno/anticuerpo y la diana

45 Cualquier anticuerpo que se une específicamente con el hapteno de interés, o un epítipo del antígeno de interés, puede utilizarse en los métodos divulgados en el presente. En un ejemplo, se determina la secuencia de las regiones determinantes de la especificidad de cada región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés. Los residuos que se encuentran fuera de la región determinante de especificidad (SDR, sitios de contacto de no ligandos) pueden ser sustituidos. Por ejemplo, se pueden sustituir como máximo uno, dos o tres aminoácidos. La producción de anticuerpos quiméricos, que incluyen una región marco de un anticuerpo y las CDR de un anticuerpo diferente, es conocida en la técnica. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos humanizados de forma rutinaria. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser una inmunoglobulina humanizada que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal de un donante que se une específicamente al antígeno de interés y los marcos de la región variable de cadena ligera y pesada de la inmunoglobulina de los marcos de la cadena ligera y pesada de la inmunoglobulina aceptora humana. Por lo general, la inmunoglobulina humanizada se une específicamente a RET con una afinidad constante de al menos $10^7 M^{-1}$, como al menos $10^8 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^8 M^{-1}$, o al menos $10^9 M^{-1}$.

60 Los anticuerpos monoclonales humanizados se pueden producir transfiriendo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del donante de las cadenas variables ligera y pesada de la inmunoglobulina del ratón donante al dominio variable humano y, a continuación, sustituyendo los residuos humanos de la región marco cuando sea necesario para conservar la afinidad. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos

monoclonales humanizados evita los potenciales problemas asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes del anticuerpo del donante. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describen, por ejemplo, en Jones et al., *Nature* 321:522, 1986 ; Riechmann et al., *Nature* 332:323, 1988 ; Verhoeyen et al., *Science* 239:1534, 1988 ; Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285, 1992 ; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992 ; y Singer et al., *J. Immunol.* 150:2844, 1993 . El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, aunque en varias realizaciones el anticuerpo es una IgG, incluyendo, a título meramente enunciativo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En una realización, la secuencia del marco de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina humanizada puede ser al menos un 65% idéntica a la secuencia del marco de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina del donante. Por tanto, la secuencia del marco de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina humanizada puede ser aproximadamente al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 99% o al menos un 95% idéntica a la secuencia del marco de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina del donante. Las regiones marco humanas y las mutaciones que se pueden realizar en las regiones marco de anticuerpo humanizado son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente estadounidense nº 5.585.089, que queda incorporada al presente por referencia).

Algunos ejemplos de anticuerpos humanos son LEN y 21/28 CL. Se trata de regiones marco que se utilizan en diversos anticuerpos que se unen a marcadores tumorales. Un experto en la técnica apreciará que se podrían utilizar otros y que estas regiones se utilizan a título ilustrativo únicamente. Las secuencias de los marcos de cadena ligera y pesada se conocen en la técnica.

Los anticuerpos, como anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, incluyen las moléculas en toda su longitud, así como fragmentos de las mismas, como Fab, F(ab')₂, y Fv que incluyen una región variable de cadena ligera y cadena pesada y son capaces de unirse al determinante epitópico. Estos fragmentos de anticuerpo conservan cierta capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor e incluyen los siguientes:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de una molécula de anticuerpo de unión al antígeno monovalente, se puede producir mediante digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para obtener una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;

(2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo, se puede producir tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para obtener una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(3) F(ab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede producir tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro;

(4) Fv, un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresado en forma de dos cadenas; y

(5) Anticuerpo de cadena sencilla (como sdFv), definido como una molécula genéticamente modificada que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, enlazadas mediante un conector polipeptídico adecuado en forma de una molécula de cadena única fusionada genéticamente.

Los métodos para producir estos fragmentos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Para producir estos anticuerpos, V_H y V_L se pueden expresar desde dos estructuras de ácido nucleico individuales en una célula hospedadora. Si V_H y V_L se expresan de forma no contigua, las cadenas del anticuerpo Fv están unidas típicamente mediante interacciones no covalentes. Sin embargo, estas cadenas tienden a disociarse tras la dilución, por lo que se han desarrollado métodos para entrelazar las cadenas mediante glutaraldehído, disulfuros intermoleculares o un conector peptídico. Así, en un ejemplo, Fv puede ser un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), en el que la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están químicamente unidas mediante enlaces disulfuro.

En otro ejemplo adicional, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas a un conector peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena simple (scFv) se preparan mediante la construcción de secuencias de ADN que comprenden un gen estructural que codifica los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedadora como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una cadena de polipéptido simple con un péptido conector que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFvs son conocidos en la técnica (véase Whitlow et al., *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 97, 1991 ; Bird et al., *Science* 242:423, 1988 ; Patente estadounidense nº 4.946.778 ; Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993 ; y Sandhu, supra).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante digestión de pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante clivaje enzimático de anticuerpos con pepsina para producir un fragmento 5S denotado F(ab')₂. Este fragmento se puede clivar también utilizando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultante del clivaje de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Alternativamente, un clivaje enzimático que utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente (véanse las Patentes estadounidenses nº 4.036.945 y 4.331.647, y las referencias incluidas en las mismas; Nisonhoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., Methods in Enzymology, Vol. 1, página 422, Academic Press, 1967; y Coligan et al., secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4).

También se pueden emplear otros métodos para el clivaje de anticuerpos, como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena pesada simple monovalentes, el posterior clivaje de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno reconocido por el anticuerpo intacto.

Un experto en la técnica apreciará que también se pueden producir variantes conservadoras de los anticuerpos. Estas variantes conservadoras empleadas en fragmentos de anticuerpos, como fragmentos dsFv o en fragmentos scFv, conservarán residuos de aminoácidos críticos necesarios para el correcto plegado y la estabilización entre las regiones V_H y V_L, y conservarán las características de carga de los residuos a fin de preservar los bajos niveles de toxicidad y pI de las moléculas. Las sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, como máximo una, como máximo dos, como máximo tres, como máximo cuatro o como máximo cinco sustituciones de aminoácidos) se pueden realizar en las regiones V_H y V_L para incrementar el rendimiento. Las tablas de sustituciones conservadoras de aminoácidos que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas por un experto en la técnica. Los seis grupos siguientes son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). Por tanto, un experto en la técnica podrá revisar fácilmente las SEC. ID. Nº: 1-2 y 5-10, localizar uno o más de los aminoácidos de la tabla anterior, identificar una sustitución conservadora, y producir la variante conservadora utilizando técnicas moleculares conocidas.

Las moléculas efectoras, como fracciones terapéuticas, de diagnóstico o detección, se pueden unir a un anticuerpo de unión específica a un antígeno de interés, utilizando diversos medios conocidos por un experto en la técnica. Pueden utilizarse medios de unión tanto covalente como no covalente. El procedimiento para unir una molécula efectora a un anticuerpo varía en función de la estructura química de la efectora. Los polipéptidos contienen típicamente diversos grupos funcionales, como ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado de un anticuerpo para producir la unión de la molécula efectora. Alternativamente, el anticuerpo es derivatizado para exponer o unir otros grupos funcionales reactivos. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas conectoras, como las comercializadas por Pierce Chemical Company, Rockford, IL. El conector puede ser cualquier molécula utilizada para unir el anticuerpo a la molécula efectora. El conector es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con la molécula efectora. Los conectores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, a título meramente enunciativo, conectores de carbono de cadena lineal o ramificada, conectores de carbono heterocíclico o conectores peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los conectores se pueden unir con los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (como a través de un enlace disulfuro a cisteína) o a los grupos carboxilo y amino del carbono alfa.

En vista del gran número de métodos documentados para unir diversos compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, etiquetas (como enzimas o moléculas fluorescentes), toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la técnica podrá determinar un método adecuado para unir un determinado agente a un anticuerpo u otro polipéptido.

XI. Descripción general de los métodos para producir anticuerpos utilizando ADN

Se pueden preparar ejemplos de ácidos nucleicos que contienen secuencias que codifican un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de interés mediante técnicas de clonación. Algunos ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación adecuadas, así como instrucciones suficientes para un experto en la práctica de la clonación, se incluyen en Sambrook et al., supra, Berger y Kimmel (eds.), supra, y Ausubel, supra. La información sobre el producto proporcionada por los fabricantes de los reactivos biológicos y equipos experimentales también

5 proporcionan información útil. Entre estos fabricantes se incluyen SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia Amersham (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), Invitrogen (San Diego, CA), y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como otras muchas fuentes comerciales conocidas por los expertos.

10 Los ácidos nucleicos también se pueden preparar mediante métodos de amplificación. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia autosostenida (3SR). Los expertos en la técnica conocen diversos métodos de clonación, células hospedadoras y metodologías de amplificación in vitro.

En un ejemplo, se prepara un anticuerpo útil insertando el ADNc que codifica una región variable de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de interés en un vector.

15 Una vez que los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo han sido aislados y clonados, la proteína se puede expresar en una célula sometida a ingeniería recombinante, como una célula de bacteria, planta, levadura, insecto y mamífero. Una o más secuencias de ADN que codifican el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se pueden expresar in vitro mediante transferencia de ADN a la célula hospedadora adecuada. La célula puede ser procarionota o eucariota. El término también incluye cualquier progenie de la célula hospedadora del sujeto. Se entiende que toda progenie podrá no ser idéntica a la célula madre, dado que se pueden producir mutaciones durante la replicación. Los métodos de transferencia estable, lo que significa que el ADN extraño se mantiene constantemente en el huésped, son conocidos en la técnica.

20 Las secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden estar operativamente unidas a secuencias de control de la expresión. Una secuencia de control de la expresión operativamente unida a una secuencia de codificación se une de forma que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión incluyen, a título meramente enunciativo, promotores, potenciadores, terminadores transcripcionales, un codón de inicio (como ATG) frente a un gen que codifica proteína, señal de separación para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la correcta translación de ARNm y codones de terminación.

25 Las secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se pueden insertar en un vector de expresión, incluyendo, a título meramente enunciativo, un plásmido, virus u otro vehículo que se pueda manipular para permitir la inserción o incorporación de secuencias y se pueden expresar en procarionotas o eucariotas. Los huéspedes pueden incluir organismos microbianos, de levaduras, insectos y mamíferos. Los métodos de expresión de secuencias de ADN que tienen secuencias virales o eucariotas en procarionotas son conocidos en la técnica. Los vectores de ADN de plásmidos y virales biológicamente funcionales con capacidad de expresión y replicación en un huésped son conocidos en la técnica.

30 La transformación de una célula hospedadora con ADN recombinante se puede realizar mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica. Cuando el huésped es procarionota, como *E. coli*, se preparan células competentes que son capaces de absorber ADN a partir de células recogidas tras la fase de crecimiento exponencial y posteriormente se tratan con el método de CaCl_2 utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede utilizar MgCl_2 o RbCl . La transformación también se puede realizar tras formar un protoplasto de la célula hospedadora si se desea o mediante electroporación.

35 Cuando el huésped es eucariota, pueden utilizarse métodos de transfección de ADN como coprecipitados de fosfato cálcico, procedimientos mecánicos convencionales, como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encapsulado en liposomas, o vectores virales. Las células eucariotas también se pueden transformar conjuntamente con secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y una segunda molécula de ADN extraño que codifica un fenotipo seleccionable, como el gen de la timidina quinasa del herpes simple. Otro método consiste en utilizar un vector viral eucariota, como el virus del simio 40 (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar transitoriamente o transformar las células eucariotas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982). Un experto en la técnica puede utilizar fácilmente sistemas de expresión como plásmidos y vectores útiles para producir proteínas en células, incluyendo las células eucariotas más desarrolladas, como las líneas celulares de COS, CHO, HeLa y mieloma.

40 El aislamiento y la purificación del polipéptido expresado recombinantemente se pueden realizar utilizando medios convencionales, incluyendo la cromatografía preparativa y las separaciones inmunológicas. Una vez expresados, los anticuerpos recombinantes se pueden purificar mediante procedimientos estándar en la técnica, incluyendo el precipitado de sulfato de amonio, las columnas de afinidad, la cromatografía en columna y similares (véase, en general, R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982). En el presente se divulgan composiciones sustancialmente puras, de al menos un 90 a un 95% de homogeneidad, y aquellas que presentan de un 98 a un

99% o más de homogeneidad se pueden utilizar con fines farmacéuticos. Una vez purificada, de forma parcial o hasta alcanzar la homogeneidad si se desea, en caso de que se vaya a utilizar con fines terapéuticos, los polipéptidos se encontrarán sustancialmente libres de endotoxina.

5 Se han descrito métodos de expresión de anticuerpos de cadena simple y/o replegada hasta una forma activa apropiada, incluyendo anticuerpos de cadena simple, partiendo de bacterias como *E. coli*, que son conocidos en la técnica y aplicables a los anticuerpos divulgados en el presente. Véase, Buchner et al., *Anal. Biochem.* 205:263-270, 1992 ; Pluckthun, *Biotechnology* 9:545, 1991 ; Huse et al., *Science* 246:1275, 1989 y Ward et al., *Nature* 341:544, 1989, incorporados todos al presente por referencia.

10 A menudo, las proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias se aíslan de los cuerpos de inclusión y exigen una solubilización utilizando potentes desnaturalizantes y su posterior repliegue. Durante el paso de solubilización, como se sabe en la técnica, debe estar presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un ejemplo de solución tampón con un agente reductor es el siguiente: 0.1 M Tris pH 8, 6 M guanidina, 2 mM EDTA, 0,3 M DTE (ditioeritritol). La reoxidación de los enlaces disulfuro se puede producir en presencia de reactivos de tior de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, tal como se describe en Saxena et al.,
15 *Biochemistry* 9: 5015-5021, 1970, incorporado al presente por referencia, y especialmente tal como se describe en Buchner et al., supra.

La renaturalización se realiza típicamente mediante dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida en solución tampón de repliegado. Un ejemplo de solución tampón es 0,1 M Tris, pH 8.0, 0,5 M L-arginina, 8 mM glutatión oxidado (GSSG), y 2 mM EDTA.

20 Como modificación del protocolo de purificación de anticuerpos de doble cadena, las regiones de la cadena pesada y ligera se solubilizan y reducen por separado y, a continuación, se combinan en la solución de repliegado. Un ejemplo de rendimiento se obtiene cuando estas dos proteínas se mezclan en un ratio molar de forma que no se supera un exceso molar de 5 veces de una proteína con respecto a la otra. Se recomienda añadir glutatión oxidado en exceso u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular a la solución de repliegado una vez que se haya
25 completado el intercambio-redox.

Además de los métodos recombinantes, los anticuerpos divulgados en el presente también se pueden producir, en su totalidad o en parte, utilizando la síntesis peptídica estándar. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de menos de unos 50 aminoácidos de longitud se puede realizar uniendo el aminoácido C-terminal de la secuencia con un soporte insoluble, seguido de la adición secuencial de los restantes aminoácidos de la secuencia. Las técnicas
30 para la síntesis en fase sólida se describen en Barany & Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A*. pp. 3-284 ; Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156, 1963 , y Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984 . Las proteínas de mayor longitud se pueden sintetizar mediante condensación de los términos amino y carboxilo de los fragmentos más cortos. Los métodos para formar enlaces peptídicos mediante activación de un extremo carboxi-terminal (como
35 mediante el uso del reactivo de acoplamiento N,N'-diciohexilcarbodiimida) son conocidos en la técnica.

XII. Antígenos

Algunos ejemplos de antígenos de interés incluyen los que se recogen a continuación:

Tabla 1

40 Ejemplos de antígenos de interés (antígenos diana)

Antígenos diana virales	Ejemplos de secuencias de antígenos diana de los antígenos diana	SEC. ID. N°:
BK	TLYKKMEQDVKVAHQ	1
	GNLPLMRKAYLRKCK	22
	TFSRMKYNICMGKCI	23
JC	SITEVECFI	2
Epstein-Barr (EBV)	QPRAPIRPI	3
citomegalovirus (CMV)	NLVPMVATV	4
HPV	YMLDLQPET(T)	5
Influenza A	GILGFVFTL	6

Antígenos diana del tumor y sus péptidos derivados		
PRAME	LYVDSLFFL	7
WT1	RMFPNAPYL	8
Survivin	ELTLGEFLKL	9
AFP	GVALQTMKQ	10
ELF2M	ETVSEQSNV	11
proteínasa 3 y su péptido PR1	VLQELNVTV	12
elastasa de neutrófilos	VLQELNVTV	13
MAGE	EADPTGHSY	14
MART	AAGIGILTV	15
tirosinasa	RHRPLQEVYPEANAPIGHNRE	16
GP100	WNRQLYPEWTEAQRDL	17
NY-Eso-1	VLLKEFTVSG	18
Herceptin	KIFGSLAFL	19
antígeno carcinoembrionario (CEA)	HLFGYSWYK	20
PSA	FLTPKKLQCV	21
Antígeno diana fúngico		
Blastomyces dermatitidis	CELDNSHEDYNWNLWFKWCSGHGR	24
	TGHGKHFYDCDWDP SHGDYSWYLW	25
	DPSHGDYSWYLWDYLCGNGHHPYD	26
	DYLCGNGHHPYDCELDNSHEDYSW	27
	DPYNCDWDPYHEKEKYDWDLW NKWCN	28
	KYDWDLW NKWCNKDPYNCDWDPYH	29

Tabla 2
Ejemplos de tumores y sus antígenos tumorales

Tumor	Antígenos diana asociados al tumor
Leucemia mielógena aguda	Tumor de Wilms 1 (WT1), preferiblemente antígeno de melanoma expresado (PRAME), PR1, proteínasa 3, elastasa catepsina G
Leucemia mielógena crónica	WT1, PRAME, PR1, proteínasa 3, elastasa, catepsina G
Síndrome mielodisplásico	WT1, PRAME, PR1, proteínasa 3, elastasa, catepsina G
Leucemia linfoblástica aguda	PRAME
Leucemia linfocítica crónica	Superviviente
Linfoma no Hodgkin	Superviviente
Mieloma múltiple	Nueva York esofágico 1 (NY-Eso-1)
Melanoma maligno	MAGE, MART, Tirosinasa, PRAME GP100

Cáncer de mama	WT1, herceptina
Cáncer de pulmón	WT1
Cáncer de próstata	Antígeno prostático específico (PSA)
Cáncer de colon	Antígeno carcinoembrionario (CEA)
Carcinoma de células renales (RCC)	Factor de crecimiento fibroblástico 5 (FGF-5)

5 Cualquier péptido antigénico (como un fragmento inmunogénico) de un antígeno de interés se puede utilizar para generar una población de linfocitos T específicos para ese antígeno de interés. En la técnica se conocen numerosos péptidos antigénicos, como antígenos virales y tumorales. La presente divulgación no se limita al uso de péptidos de antígenos específicos. Algunos ejemplos concretos de péptidos antigénicos de antígenos de interés incluyen, a título meramente enunciativo, aquellos antígenos asociados a virus, hongos y tumores, como los descritos en la Tabla 1. Otros péptidos antigénicos adicionales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Novellino et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 54(3):187-207, 2005 , y Chen et al., *Cytotherapy*, 4:41-8, 2002 , ambos incorporados al presente por referencia).

10 A pesar de que la Tabla 1 divulga fragmentos concretos de antígenos de interés de longitud completa, un experto en la técnica reconocerá que también se pueden utilizar otros fragmentos o la proteína de longitud completa en los métodos divulgados en el presente. En un ejemplo, un antígeno de interés es un "fragmento inmunogénico" de una secuencia de antígeno de longitud completa. Un "fragmento inmunogénico" se refiere a una porción de una proteína que se puede utilizar para inducir una respuesta inmune, como una respuesta de linfocitos B, como la producción de anticuerpos. Típicamente, estos fragmentos tienen de 8 a 12 aminoácidos contiguos de un antígeno de longitud completa, aunque por supuesto también se pueden utilizar fragmentos más largos. En ejemplos concretos, el fragmento inmunogénico tiene 8-100 aminoácidos contiguos de una secuencia de antígeno diana de longitud completa, como 8-50 aminoácidos, 8-20 aminoácidos, o 10, 20, 30, 40, 50, 100 o 200 aminoácidos contiguos de una secuencia de antígeno diana de longitud completa.

20 A través del estudio de los análogos de antígenos con un único aminoácido sustituido y la secuenciación de péptidos naturalmente procesados y unidos endógenamente, se han identificado los residuos críticos correspondientes a los motivos necesarios para producir moléculas antigénicas (véase, por ejemplo, Southwood et al., *J. Immunol.* 160:3363, 1998 ; Rammensee et al., *Immunogenetics* 41:178, 1995 ; Rammensee et al., *J. Curr. Opin. Immunol.* 10:478, 1998 ; Engelhard, *Curr. Opin. Immunol.* 6:13, 1994 ; Sette and Grey, *Curr. Opin. Immunol.* 4:79, 1992).

25 En vista de las numerosas realizaciones posibles a las que se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas son únicamente ejemplos preferibles de la invención y no se interpretará que limitan el ámbito de aplicación de la invención. No obstante, el ámbito de aplicación de la invención se define mediante las reivindicaciones siguientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ventana Medical Systems, Inc.

Kosmeder, Jerome

5 Lefever, Mark

Bieniarz, Christopher

Farrell, Michael

Johnson, Donald

Zhilina, Zhanna

10

<120> HAPTENOS, CONJUGADOS DE HAPTENOS, COMPOSICIONES DE LOS MISMOS, Y MÉTODO PARA SU PREPARACIÓN Y USO

<130> 7668-76290-04

15

<140> 07867341.5

<141> 2007-11-01

<150> US 60/856,133

20

<151> 2006-11-01

<160> 29

<170> Versión de la patente 3.5

25

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 1

Thr Leu Tyr Lys Lys Met Glu Gln Asp Val Lys Val Ala His Gln
 1 5 10 15

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 2

10 Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu
 1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 3

20 Gln Pro Arg Ala Pro Ile Arg Pro Ile
 1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 4

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 5

10 Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 6

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 7

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 7

Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 8

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 9

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 9

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5 10

<210> 10

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 10

Gly Val Ala Leu Gln Thr Met Lys Gln
1 5

25

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 11

Glu Thr Val Ser Glu Gln Ser Asn Val
1 5

5 <210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 12

Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val
1 5

210> 13

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 13

Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val
1 5

20

210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 14

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 15

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

10 <210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 16

Arg His Arg Pro Leu Gln Glu Val Tyr Pro Glu Ala Asn Ala Pro Ile
1 5 10 15

Gly His Asn Arg Glu
20

<210> 17

<211> 16

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

25

<400> 17

Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp
1 5 10 15

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 18

Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly
1 5 10

10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 19

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 20

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 20

His Leu Phe Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys
1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 21

Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val
1 5 10

10 <210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 22

Gly Asn Leu Pro Leu Met Arg Lys Ala Tyr Leu Arg Lys Cys Lys
1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 23

Thr Phe Ser Arg Met Lys Tyr Asn Ile Cys Met Gly Lys Cys Ile
 1 5 10 15

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 24

Cys Glu Leu Asp Asn Ser His Glu Asp Tyr Asn Trp Asn Leu Trp Phe
 1 5 10 15

Lys Trp Cys Ser Gly His Gly Arg
 20

10 <210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 25

Thr Gly His Gly Lys His Phe Tyr Asp Cys Asp Trp Asp Pro Ser His
 1 5 10 15

Gly Asp Tyr Ser Trp Tyr Leu Trp
 20

<210> 26

<211> 24

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 465 465 T3

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 26

Asp Pro Ser His Gly Asp Tyr Ser Trp Tyr Leu Trp Asp Tyr Leu Cys
1 5 10 15

Gly Asn Gly His His Pro Tyr Asp
20

<210> 27

<211> 24

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 27

Asp Tyr Leu Cys Gly Asn Gly His His Pro Tyr Asp Cys Glu Leu Asp
1 5 10 15

Asn Ser His Glu Asp Tyr Ser Trp
20

10

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

<400> 28

Asp Pro Tyr Asn Cys Asp Trp Asp Pro Tyr His Glu Lys Tyr Asp Trp
1 5 10 15

Asp Leu Trp Asn Lys Trp Cys Asn
20

20 <210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del antígeno diana

5

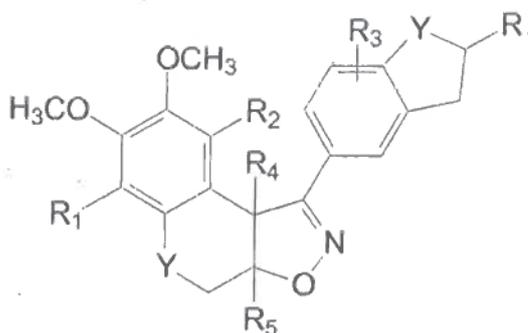
<400> 29

Lys Tyr Asp Trp Asp Leu Trp Asn Lys Trp Cys Asn Lys Asp Pro Tyr
1 5 10 15

Asn Cys Asp Trp Asp Pro Tyr His
20

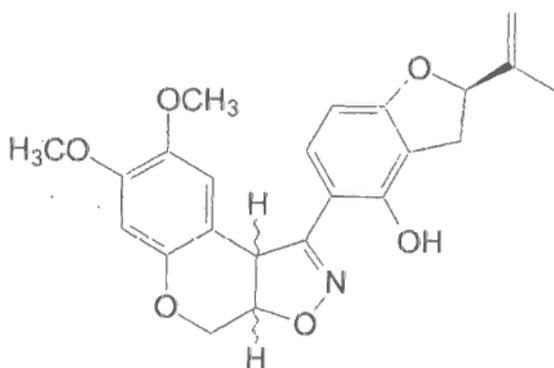
REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar dos o más dianas diferentes en una muestra, que consiste en lo siguiente:
- 5 poner en contacto la muestra con dos o más fracciones de unión específica que se unen específicamente a dos o más dianas diferentes, donde las dos o más fracciones de unión específica se conjugan con diferentes haptenos, siendo al menos uno de los haptenos una primera isoxazolina de rotenona con la fórmula



- 10 donde R-R₅ son, independientemente, hidrógeno, aldehído, alcoxi, alifático, alifático sustituido, heteroalifático, amino, aminoácido, amido, ciano (-CN), halógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima, éter de oxima, alquil hidroxil, cetona, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, carboxilo, carboxilato, éster, éster de alquilo, acilo, exometileno, éter, cíclico, heterocíclico, arilo, alquil arilo, heteroarilo, carbohidrato, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y combinaciones de los mismos; Y es oxígeno, una amina o azufre; y al menos uno de los sustituyentes R-R₅ está
- 15 unido a un conector o a una molécula vehículo, siendo el otro hapteno un oxazol, un pirazol, un tiazol, un benzofurazano, un triterpeno, una urea, una tiourea, un nitroarilo distinto de dinitrofenilo, una segunda isoxazolina de rotenona distinta de la primera isoxazolina de rotenona, una cumarina, un ciclignano, un heterobiarilo, un azoarilo o una benzodiacepina;
- 20 poner en contacto la muestra con dos o más anticuerpos anti-hapteno diferentes que se pueden detectar por separado; y
- detectar los anticuerpos anti-hapteno.

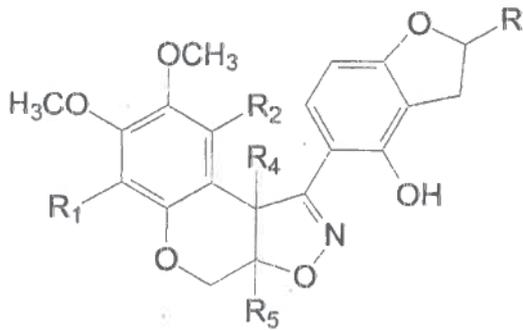
2. Un método para detectar una diana en una muestra, que consiste en lo siguiente: poner en contacto la muestra con una fracción de unión específica que se une de forma específica a una diana, estando conjugada la
- 25 fracción de unión específica con un hapteno de isoxazolina de rotenona con la fórmula



poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente al hapteno de isoxazolina de rotenona;
y

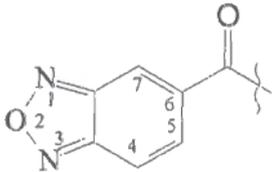
detectar el anticuerpo que se une específicamente al hapteno de isoxazolina de rotenona:

- 5 3. El método de conformidad con la reivindicación 1 donde la primera isoxazolina de rotenona tiene una fórmula

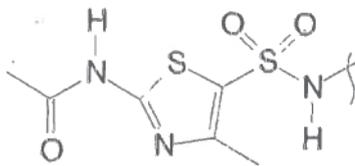


- 10 donde R-R₂ y R₄-R₅ son, independientemente, alifático, alcoxi, alquil hidroxilo, hidrógeno o hidroxilo.

4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde el otro hapteno es

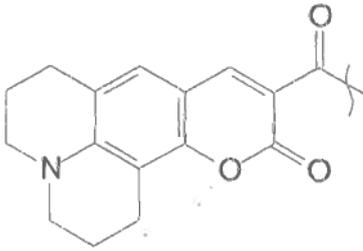


y/o donde el otro hapteno es

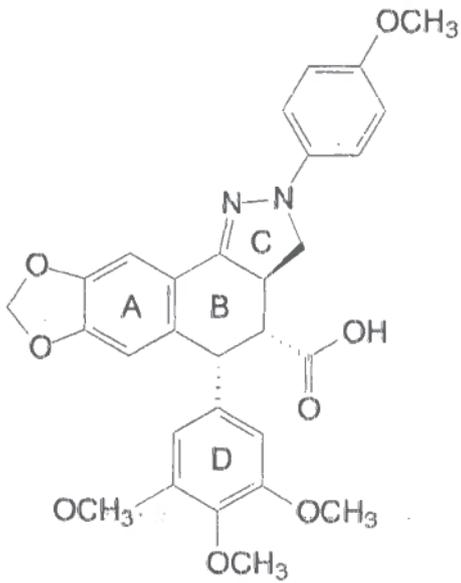


15

y/o el otro hapteno es

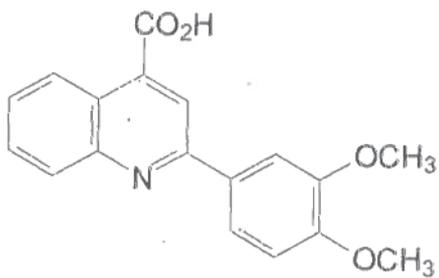


y/o el otro hapteno es

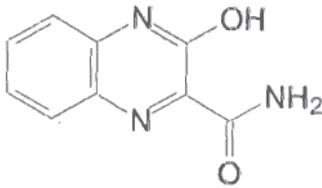


y/o el otro hapteno es

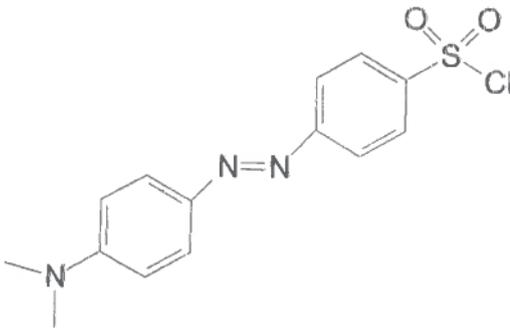
5



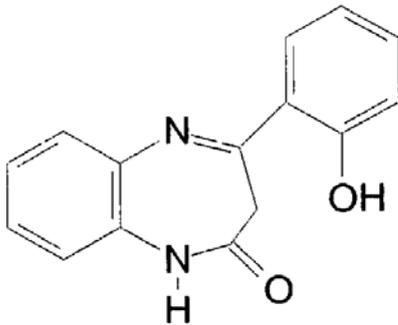
y/o el otro hapteno es



y/o el otro hapteno es



5 y/o el otro hapteno es



10 5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R-R₅ son, independientemente, alifático, alifático sustituido, hidrógeno o hidroxilo.

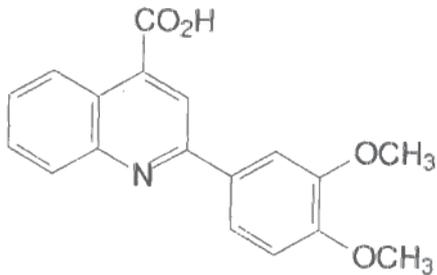
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde Y es oxígeno.

15 7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R-R₅ son, independientemente, hidrógeno o hidroxilo, e Y es oxígeno.

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde Y es -NH.

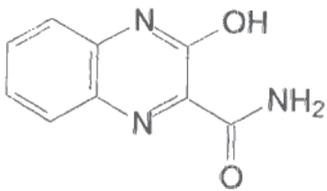
20 9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-3 que consiste asimismo en lo siguiente: poner en contacto la muestra con una segunda fracción de unión específica, que se une de forma específica a una segunda diana diferente en la muestra, estando la segunda fracción de unión específica

conjugada con un hapteno de heteroarilo que tiene una estructura química



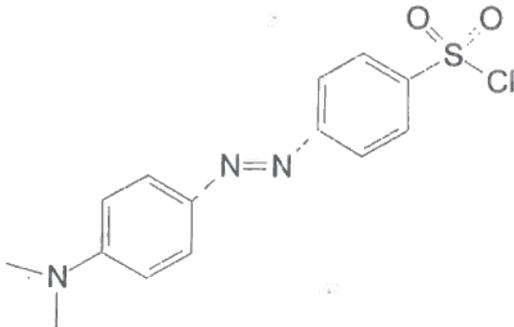
o bien

5 conjugada con un hapteno de heteroarilo que tiene una estructura química



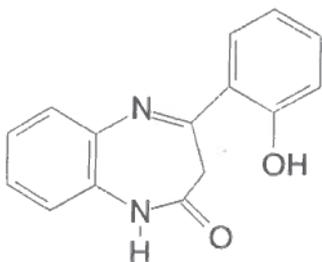
o bien

10 conjugada con un hapteno de azoarilo que tiene una estructura química



o bien

conjugada con un hapteno de benzodiazepina que tiene una estructura química



15 poniendo en contacto la muestra con un segundo anticuerpo que se une específicamente al hapteno de heteroarilo;
y

detectando el segundo anticuerpo que se une específicamente al hapteno de heteroarilo de forma separada del anticuerpo que se une específicamente al hapteno de isoxazolina de rotenona.

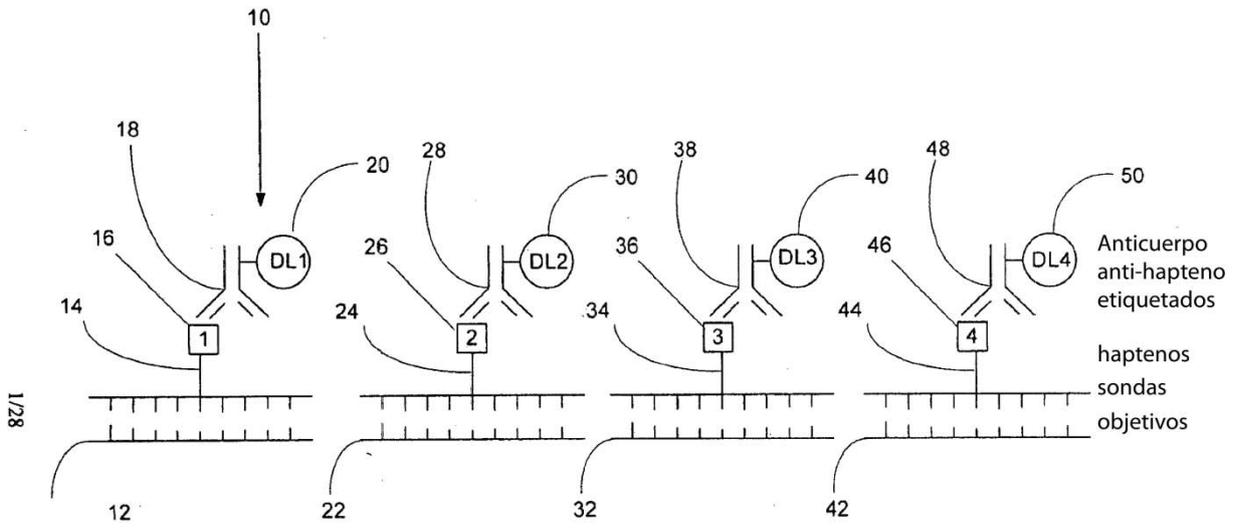


FIG. 1

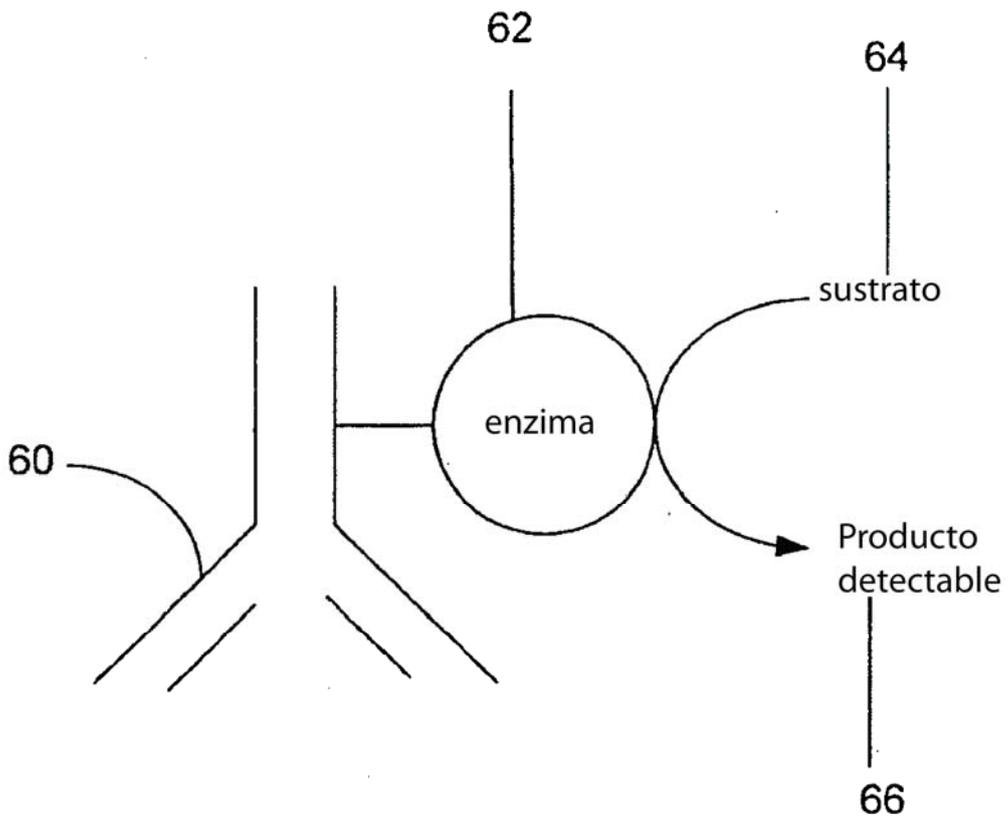


FIG. 2

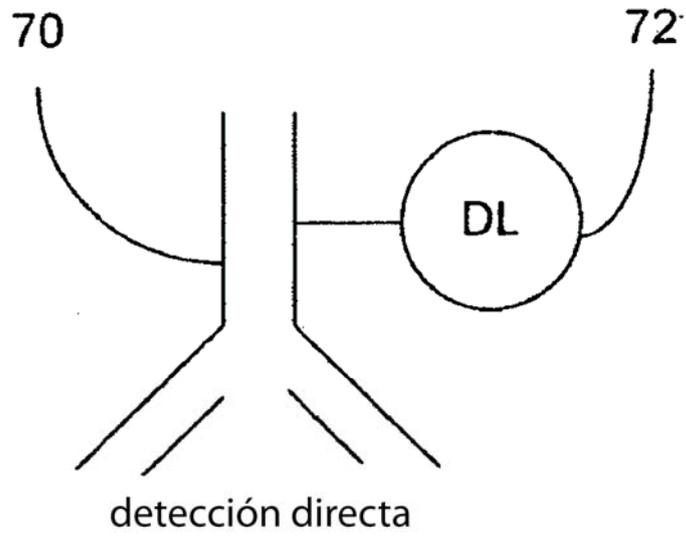
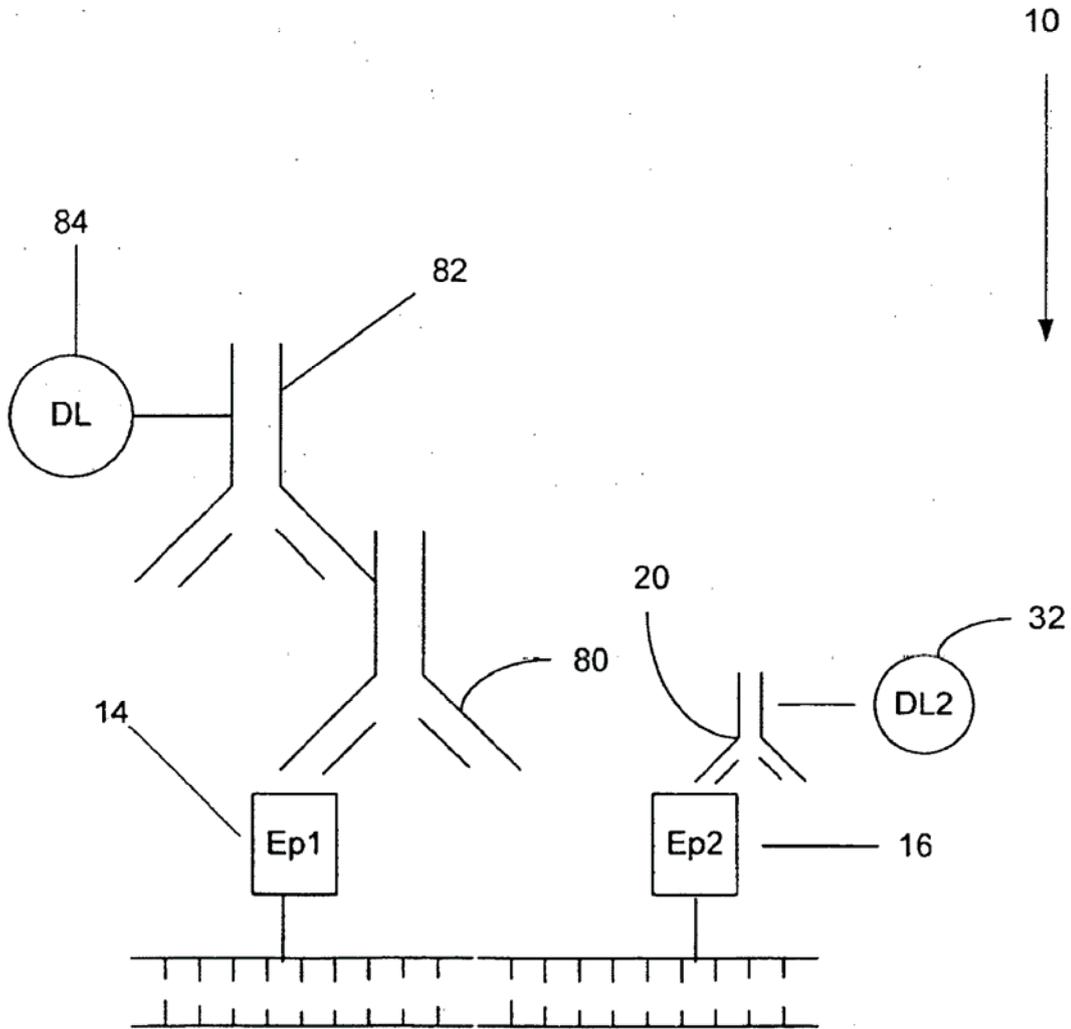


FIG. 3

FIG. 4



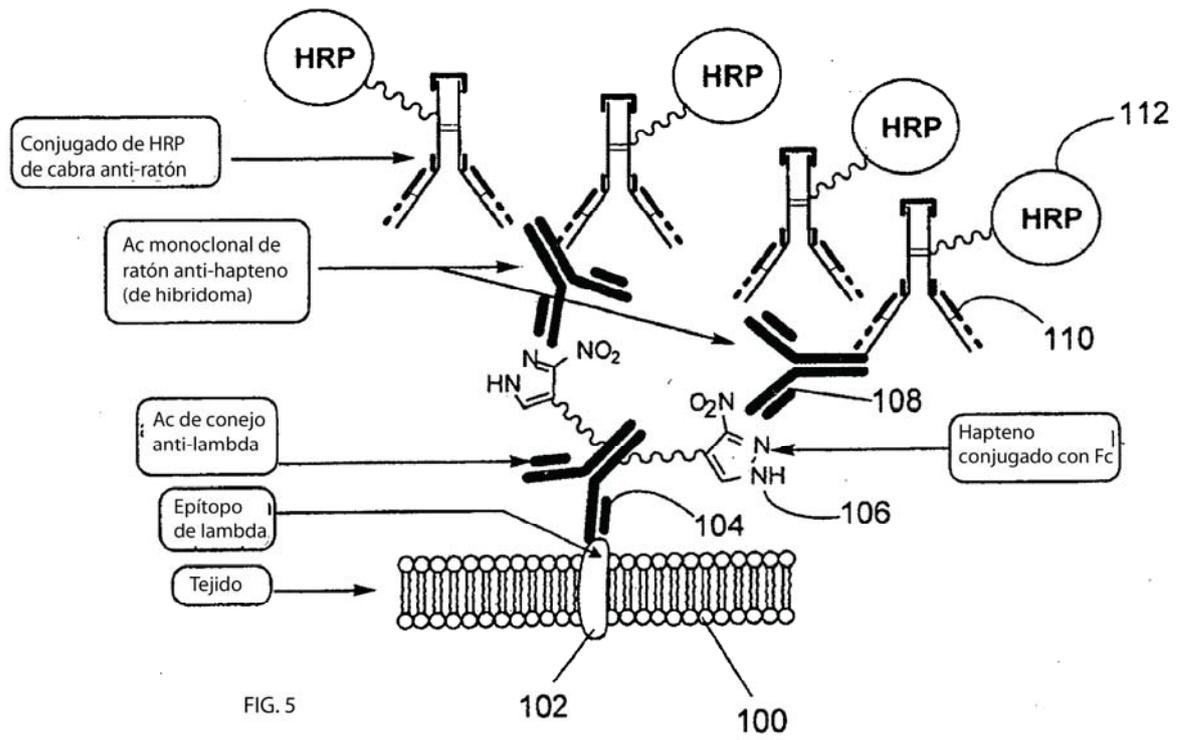


FIGURA 5

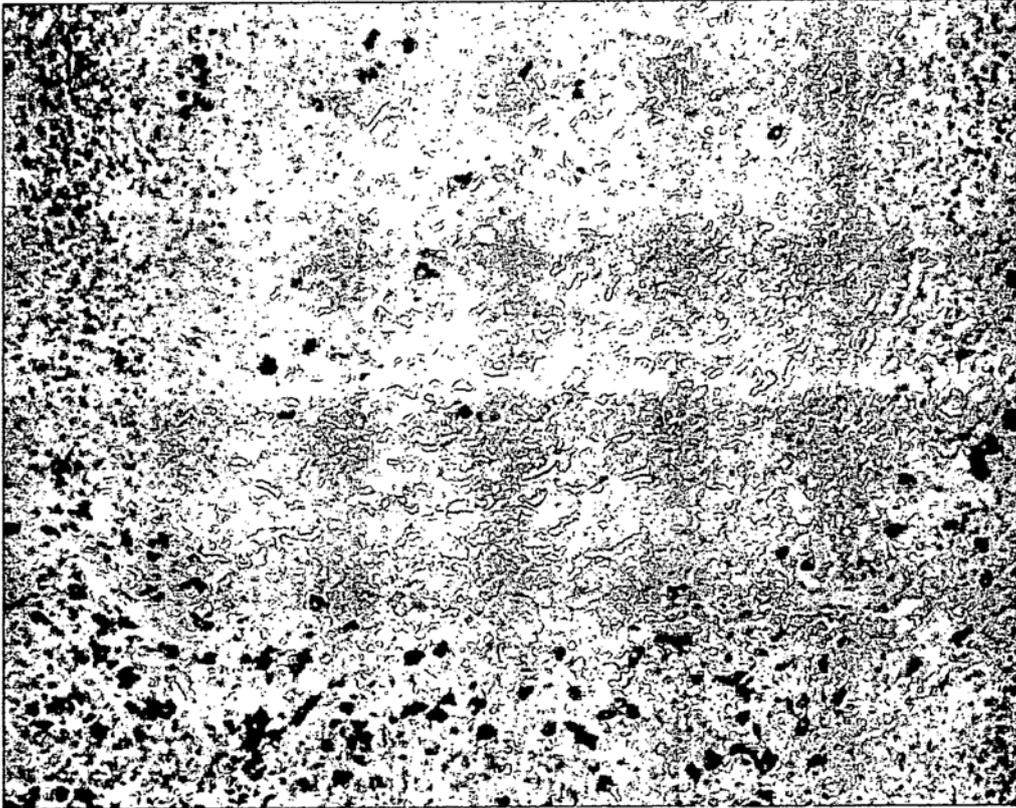


FIG. 6

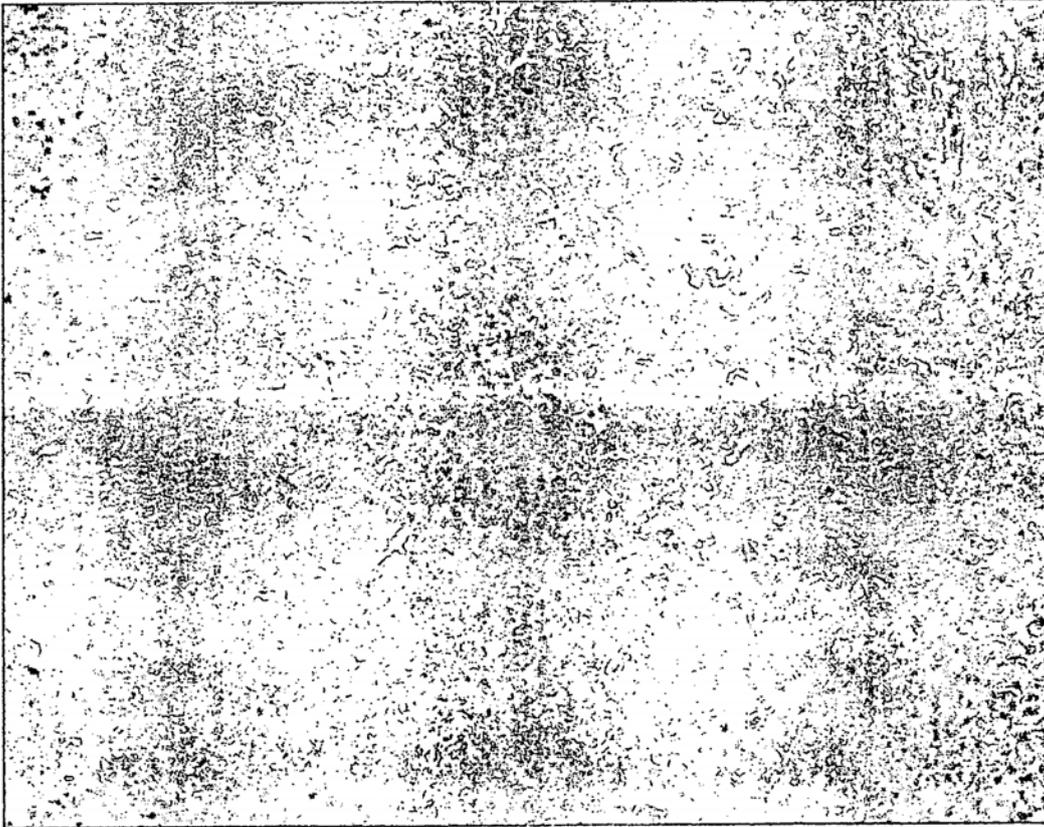


FIG. 7

Detección IHC de Qdot-hapteno

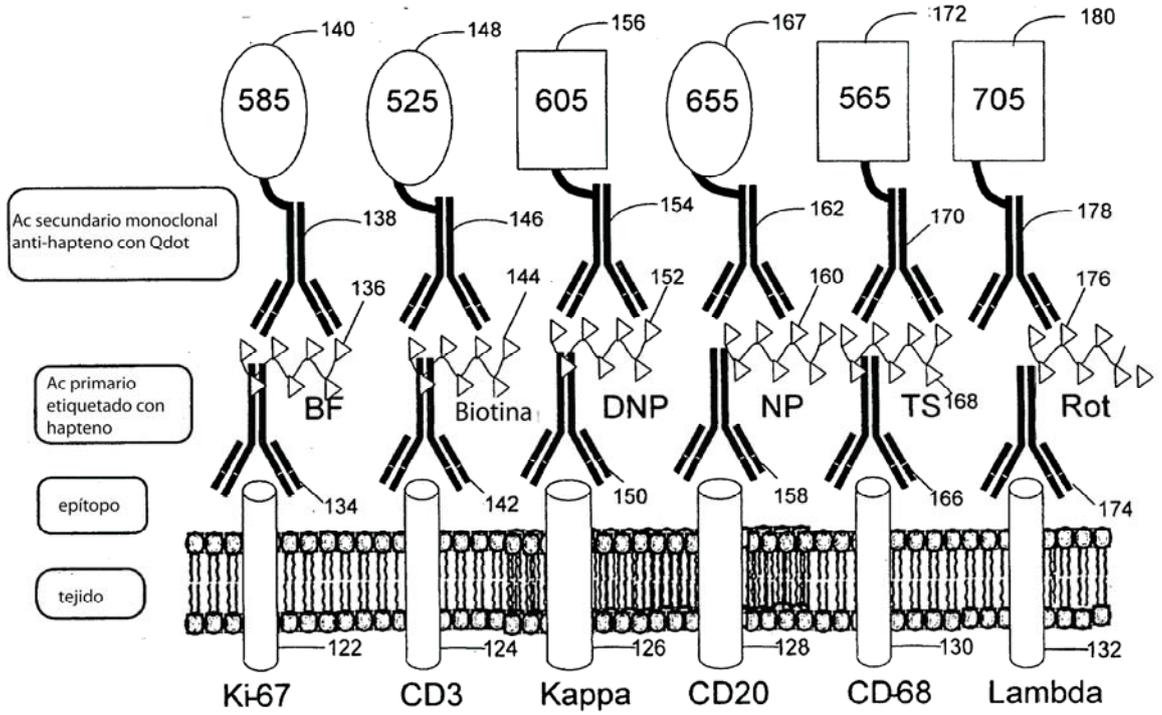


FIG. 8

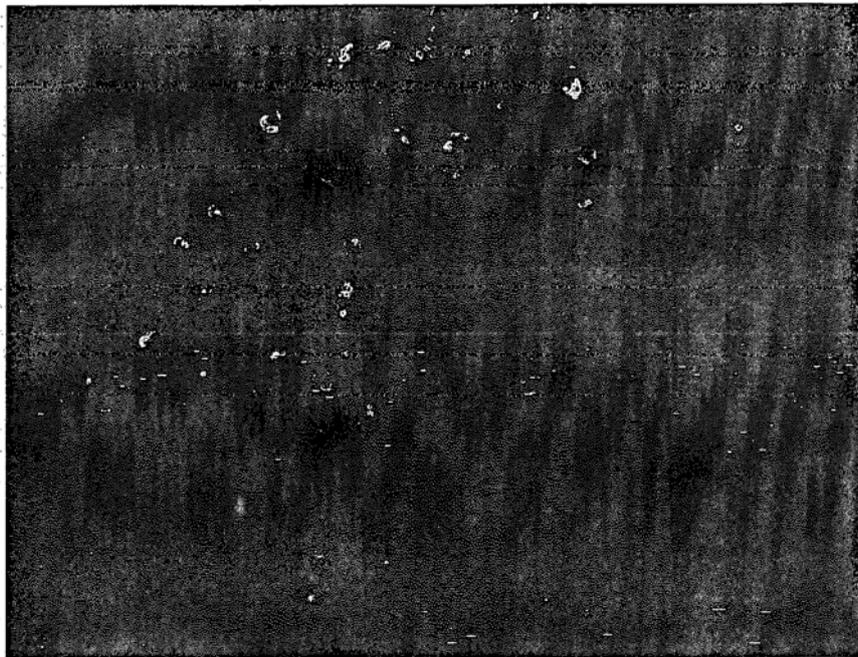


FIG. 9

8/28



FIG. 11

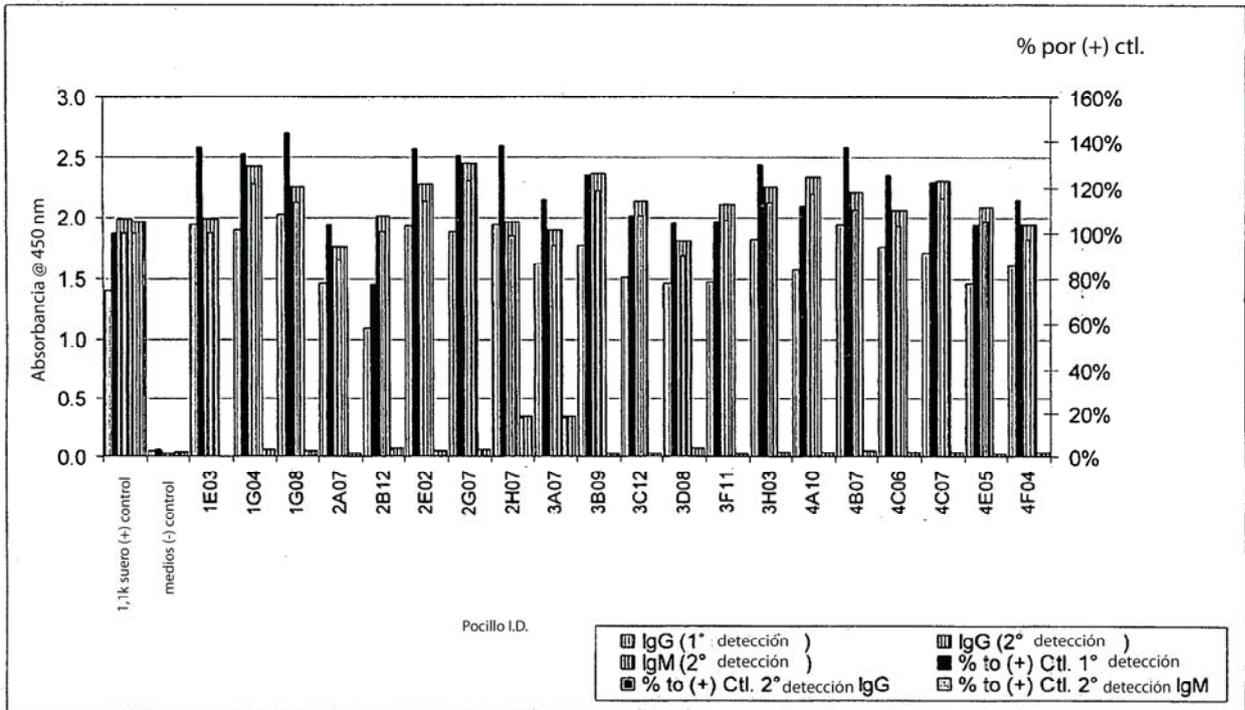


FIG. 12

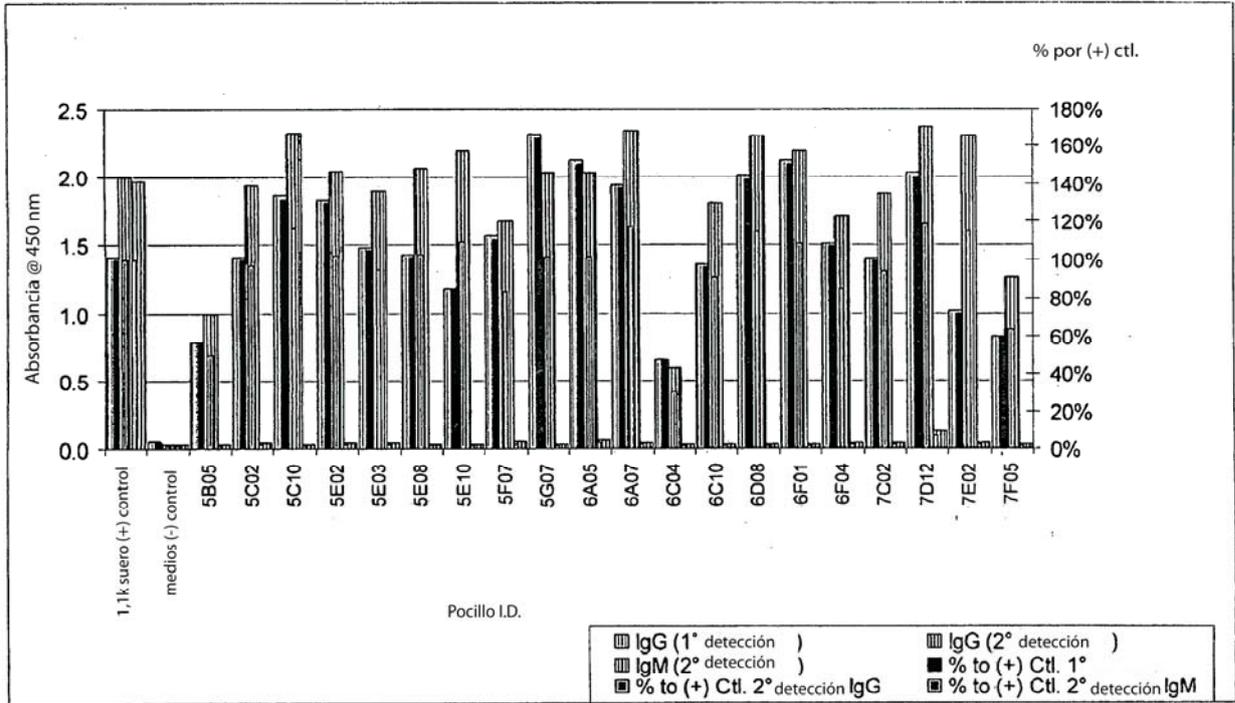


FIG. 13

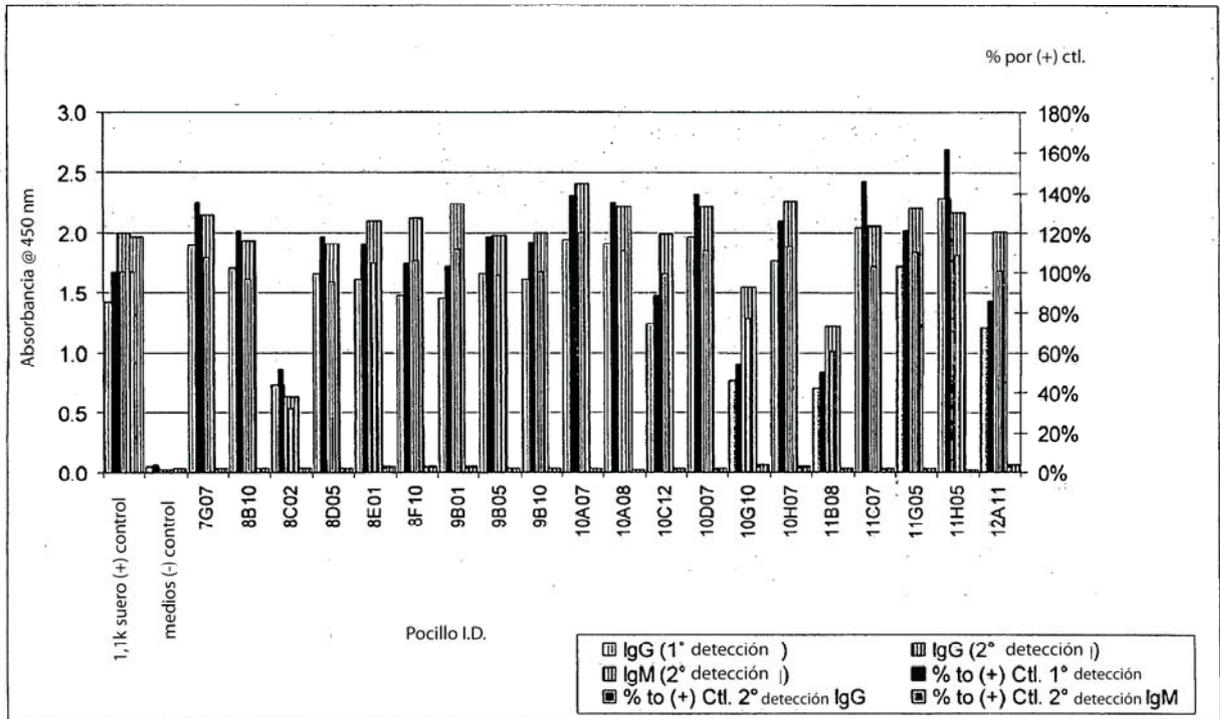


FIG. 14

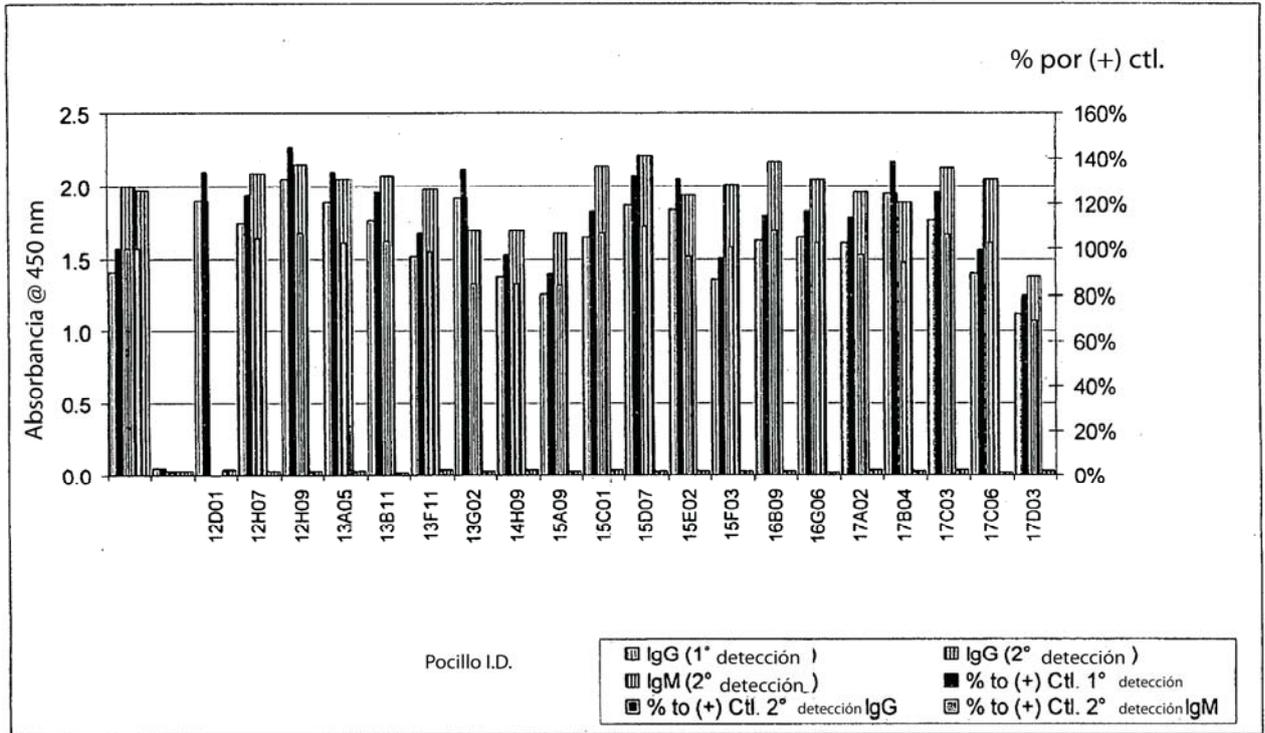


FIG. 15

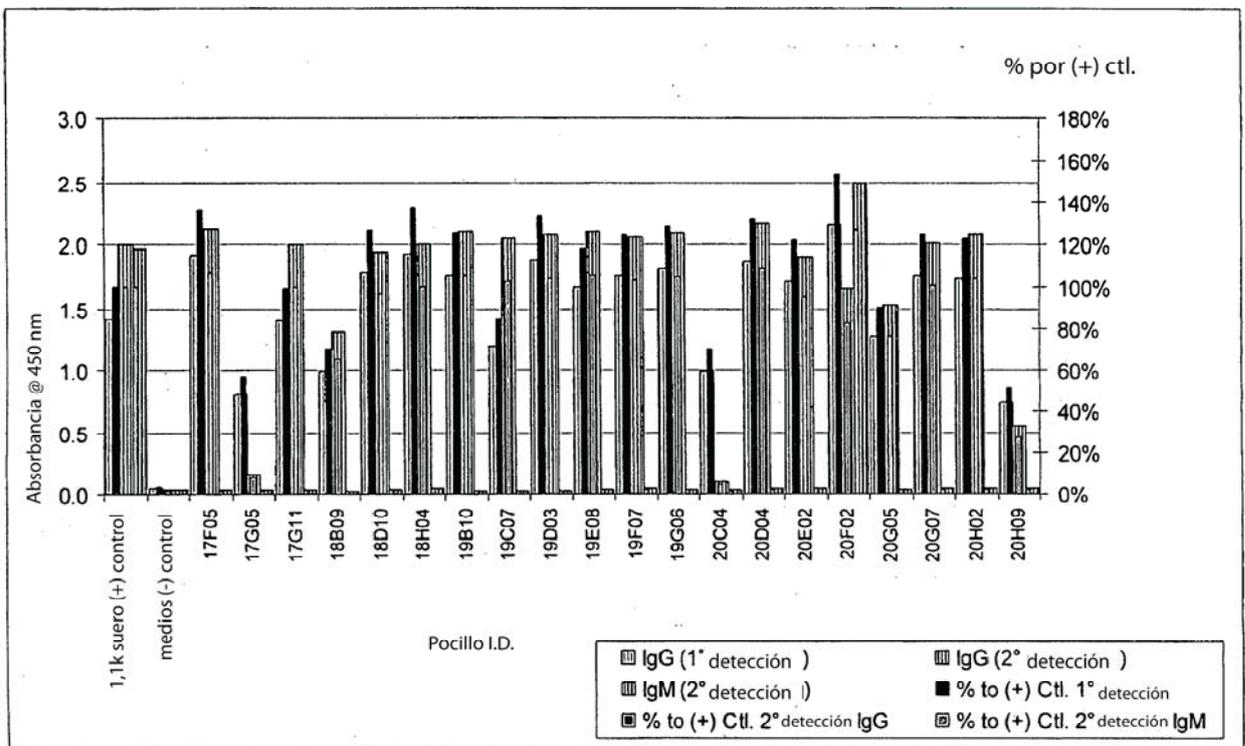


FIG. 16

% Nuc. etiquetado frente a concentración DNP-P-C

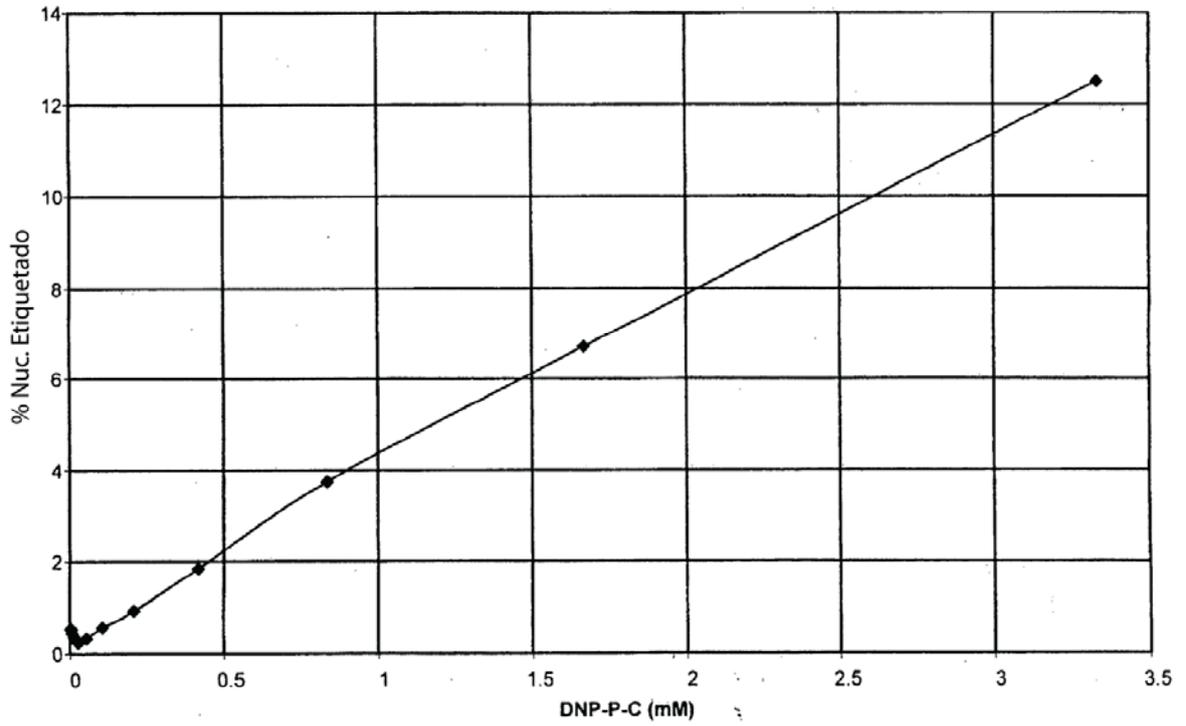


FIG. 17

Efecto de conc. ADN sobre % nuc. Etiquetado (1mM stock de DNP-P-C).

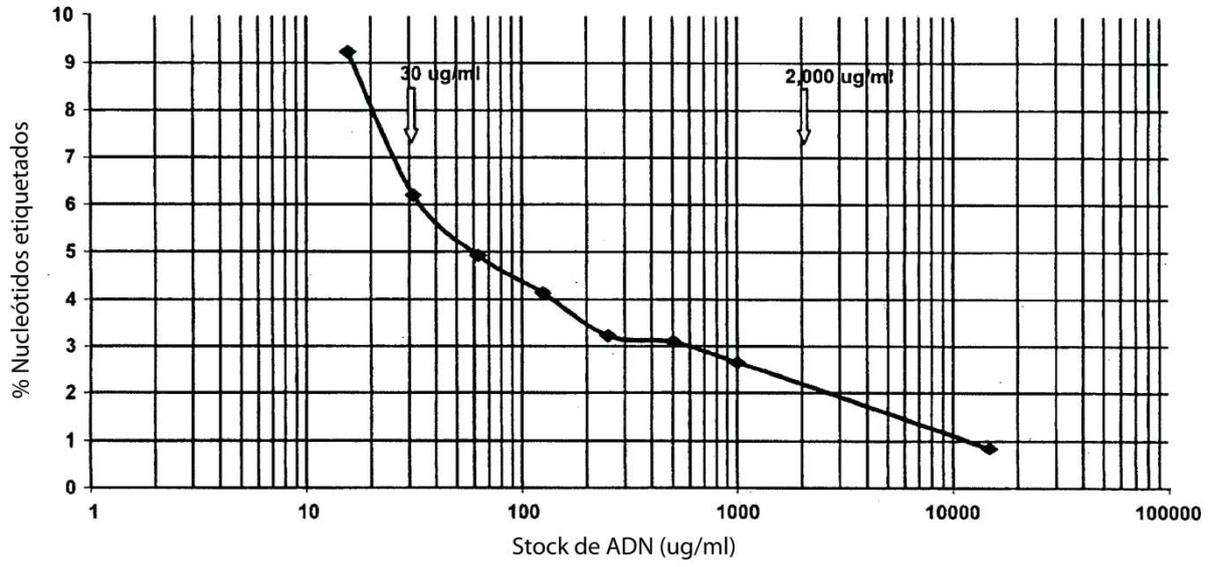


FIG. 18

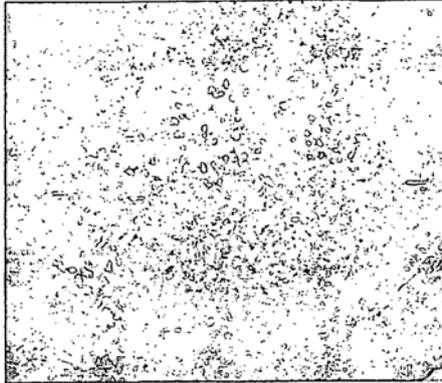


FIG. 19



FIG. 20

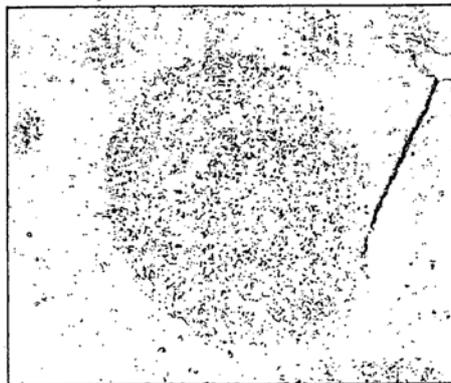


FIG. 21



FIG. 22

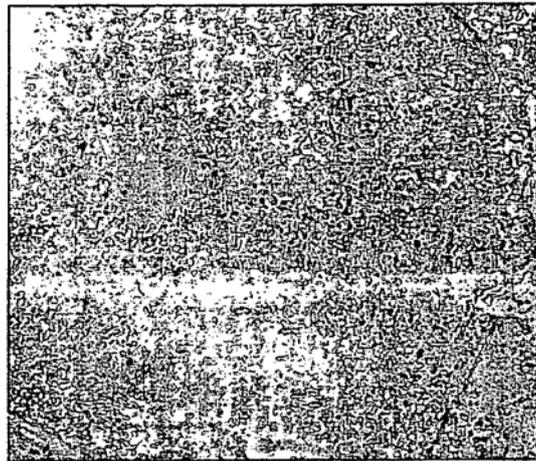


FIG. 23



FIG. 24

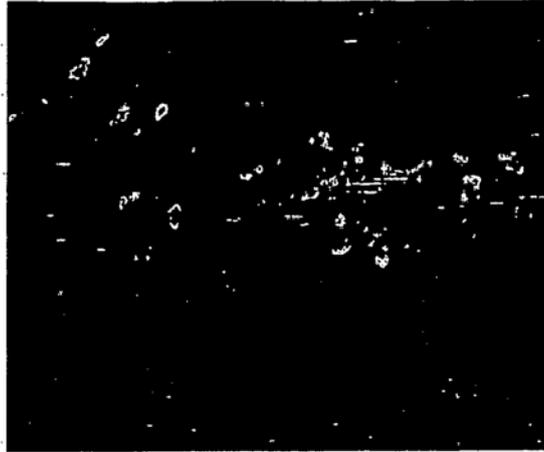


FIG. 25

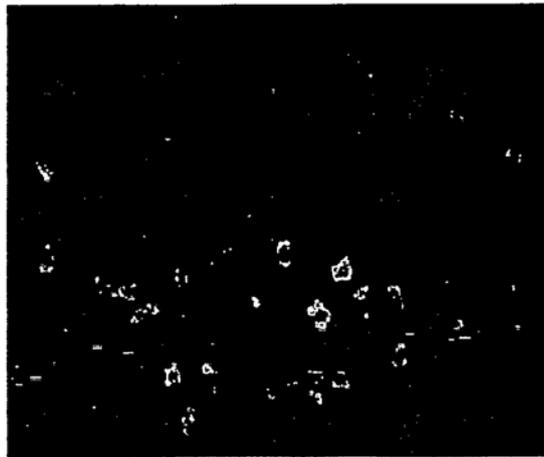


FIG. 26



FIG. 27

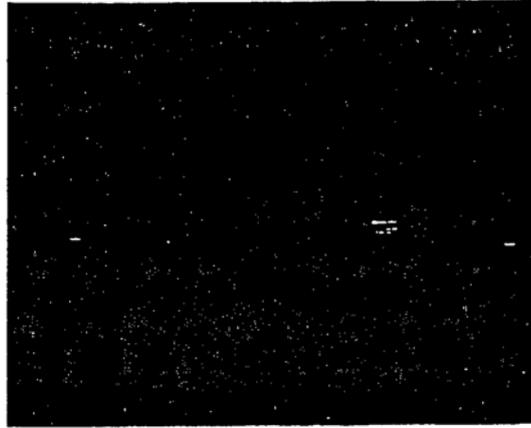


FIG. 28

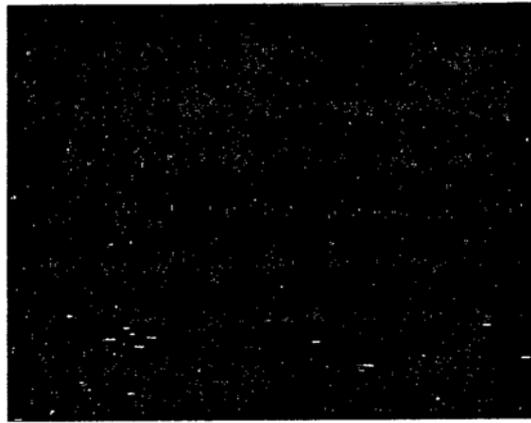


FIG. 29



FIG. 30

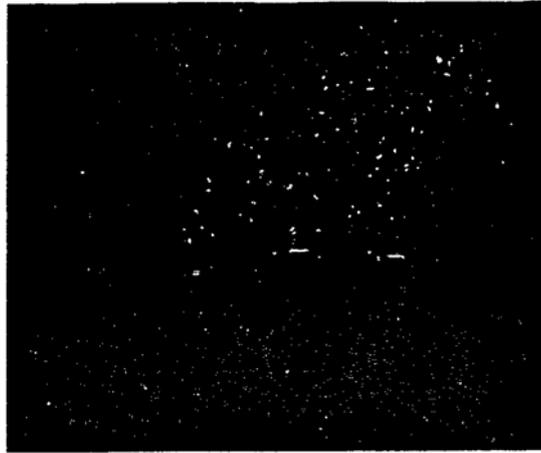


FIG. 31

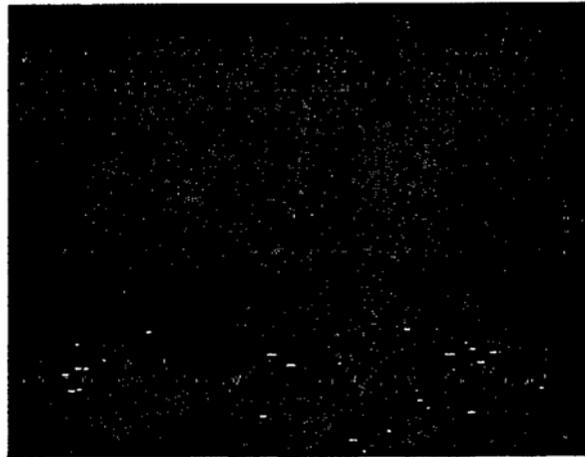


FIG. 32

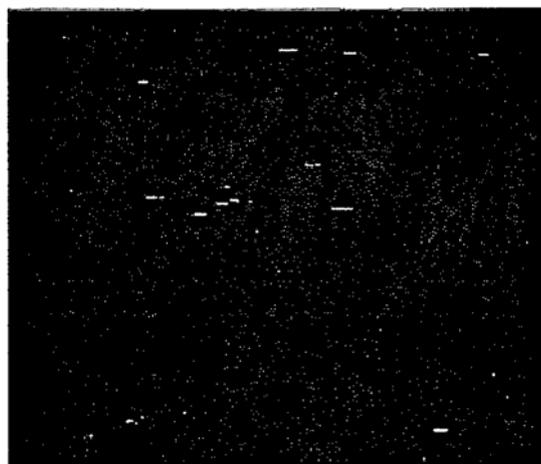


FIG. 33



FIG. 34



FIG. 35



FIG. 36

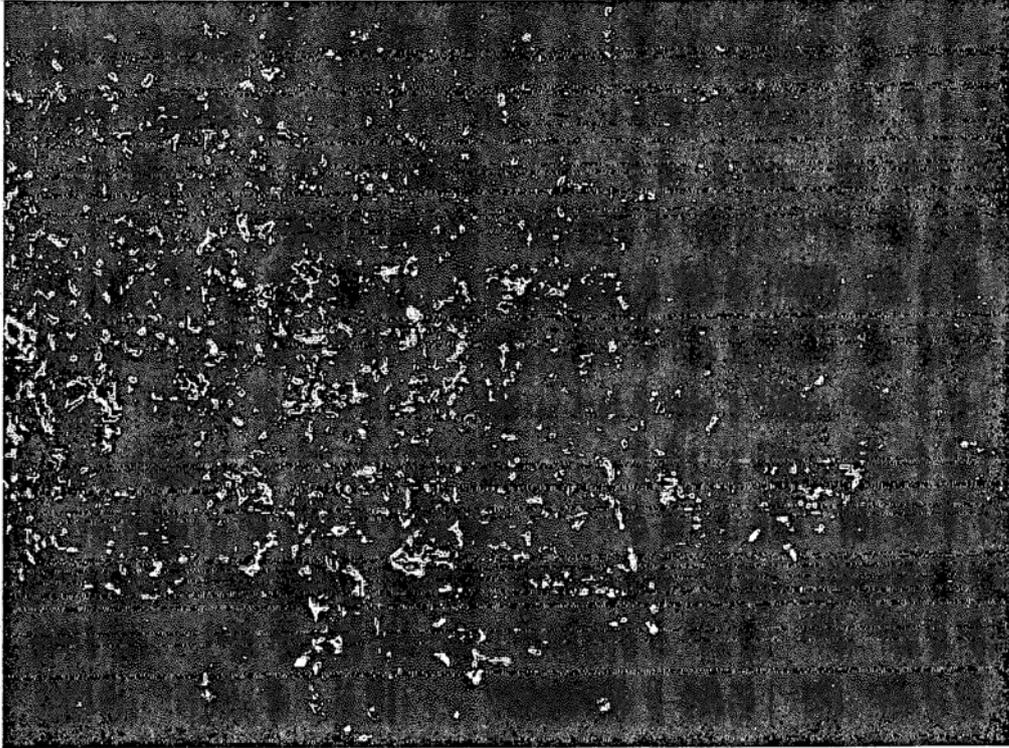


FIG. 37



FIG. 38

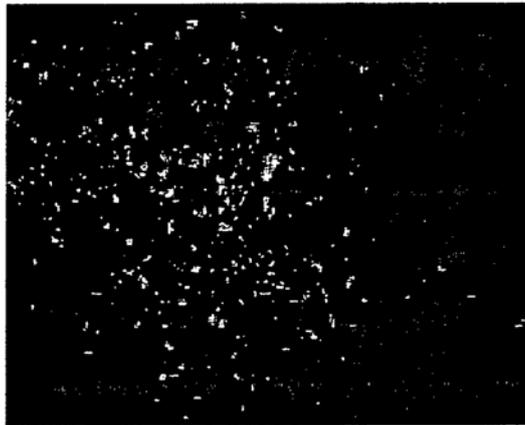


FIG. 39



FIG. 40

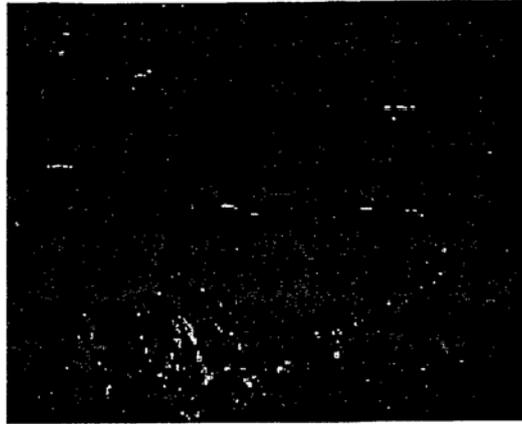


FIG. 41

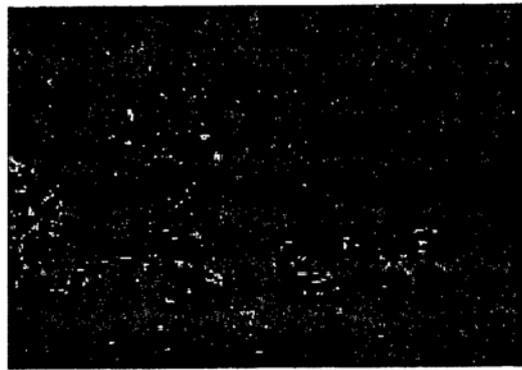


FIG. 42

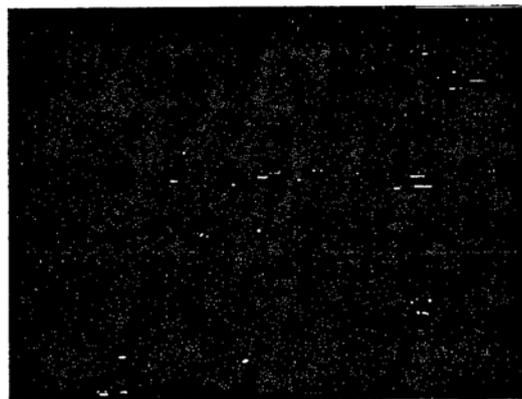


FIG. 43

Espectros para región/punto seleccionado

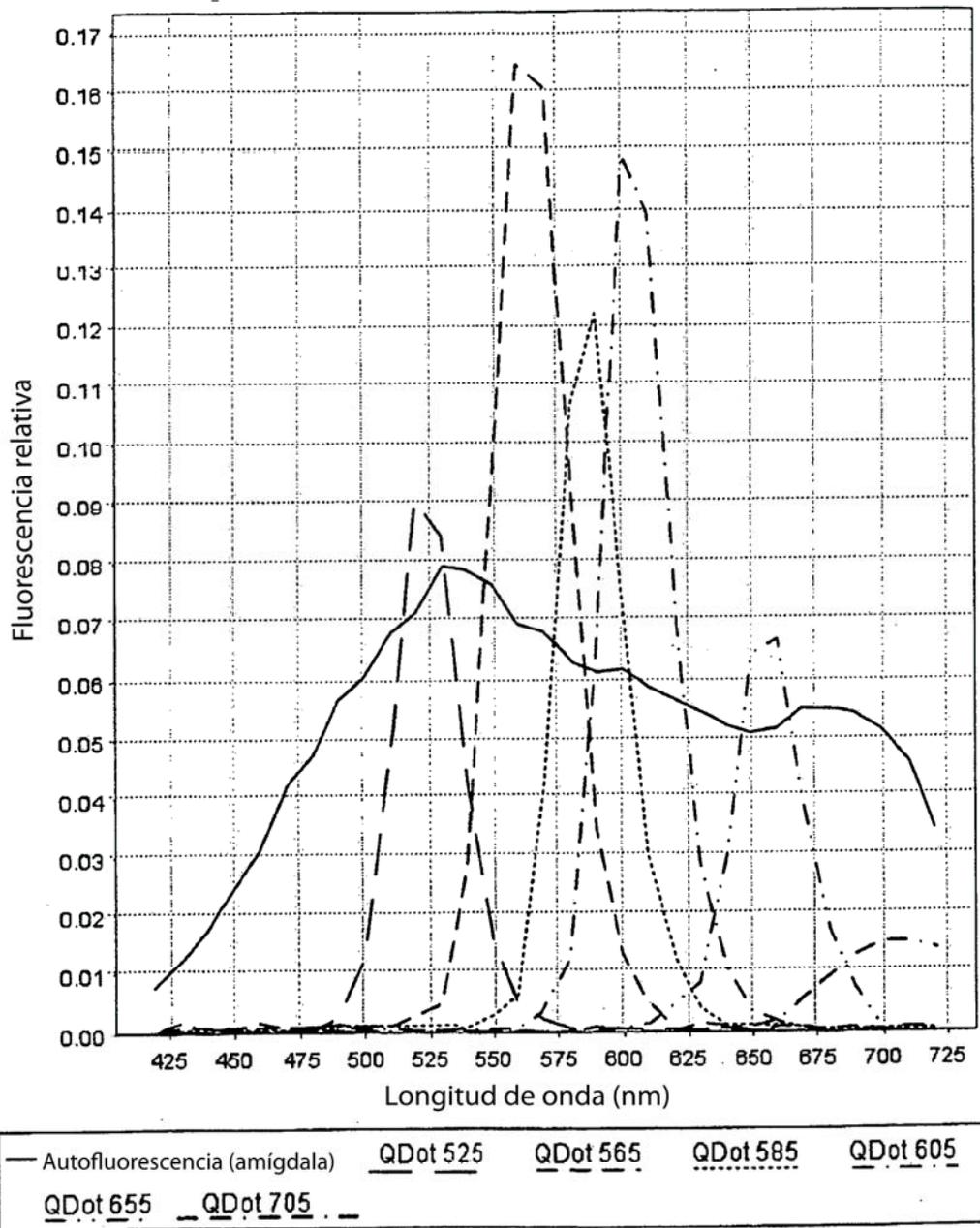


FIG. 44