

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 970**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2006 E 06820492 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 1968641**

54 Título: **Producción de conjugados**

30 Prioridad:

12.12.2005 GB 0525223
21.07.2006 GB 0614533

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2014

73 Titular/es:

INNOVA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
BABRAHAM HALL, BABRAHAM
CAMBRIDGE CB2 4AT, GB

72 Inventor/es:

GEE, NICHOLAS, STEVEN y
KNOWLES, MICHAEL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 483 970 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

Producción de conjugados

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la producción de conjugados, y se refiere a un método y a un kit para llevar a cabo el método.

Antecedentes de la invención

10 Los conjugados se usan ampliamente en investigación biocientífica, en el diagnóstico y en medicina. En el caso más simple, los conjugados toman la forma de una primera entidad química (A), típicamente una molécula tal como una biomolécula, que está enlazada a una segunda entidad química (B), tal como una molécula marcadora, para formar un híbrido AB. También son posibles las formas oligoméricas, representadas por la fórmula A_jB_k , en la que j y k son números enteros. Los conjugados se diseñan habitualmente para un fin específico, y a menudo implican nuevas combinaciones de materiales que no son de origen natural. Típicamente, un componente del conjugado tiene la capacidad de interactuar con otras moléculas (por ejemplo antígenos), por ejemplo que es un anticuerpo, y el segundo componente añade alguna otra propiedad útil (por ejemplo capacidad de medición, capacidad para exterminar células cancerosas), por ejemplo que es un marcador.

15 Los conjugados pueden comprender combinaciones de entidades, en las que A y/o B pueden comprender uno de los siguientes: anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, perlas, polímeros, liposomas, hidratos de carbono, proteínas y colorantes fluorescentes, péptidos, radionúclidos, toxinas, partículas de oro, estreptavidina, biotina, enzimas, agentes quelantes, haptenos, fármacos, y muchas otras moléculas. La lista engloba un vasto conjunto de moléculas, y de este modo el número de combinaciones posibles en los conjugados es casi ilimitado. Se concluye que hay un alcance considerable para crear nuevas moléculas híbridas con propiedades únicas o no habituales.

20 Una de las aplicaciones más importantes de los inmunoconjugados es la cuantificación y/o detección de antígenos, que a menudo se presentan en una superficie. Por ejemplo, en las aplicaciones de transferencia western, el antígeno se inmoviliza en una lámina de nitrocelulosa; en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), el antígeno se adsorbe sobre la superficie de una placa de poliestireno; en inmunohistoquímica, el antígeno está embebido, junto con muchas otras proteínas, en una rebanada delgada de tejido, que está unida a un portaobjetos de vidrio. Aunque estas técnicas difieren fundamentalmente en la forma en la que el antígeno es presentado al conjugado, la elección de los métodos de detección es esencialmente la misma. Hay dos tipos principales. Con la detección directa, el anticuerpo "primario" (es decir, el anticuerpo que se une al antígeno) se conjuga a un marcador que se puede medir con un dispositivo de medida adecuado. Con la detección indirecta, el marcador se introduce vía un segundo reactivo, que se une al anticuerpo primario. El reactivo secundario más a menudo es un conjugado de anticuerpo que comprende un anticuerpo secundario conjugado a un marcador. Existen más estrategias de detección complejas, pero cada una de estas generalmente es una variación de uno de los dos temas anteriores.

35 Con los métodos indirectos, un reactivo secundario se puede usar con un abanico de anticuerpos primarios no marcados, lo que es extremadamente conveniente, aunque la necesidad de más etapas de incubación y de lavado que con los métodos directos es una desventaja importante. Existe también el potencial de una reactividad cruzada indeseada del anticuerpo secundario con antígenos inmovilizados. Aunque los métodos de detección directos ofrecen ventajas considerables en términos de velocidad, coste, y calidad de datos, los métodos indirectos predominan actualmente. La explicación para este hecho es que la mayoría de los anticuerpos primarios están comercialmente disponibles sólo en una forma no marcada. Además, estos reactivos son caros y habitualmente no se pueden adquirir por investigadores en cantidades que permitan la producción, eficaz desde el punto de vista del coste, de conjugados marcados usando metodologías de marcaje actuales.

45 A fin de producir un conjugado, generalmente se usa un reactivo bifuncional, que contiene dos grupos reactivos, para enlazar los dos componentes de interés. Los grupos reactivos en el reactivo bifuncional son idénticos en funcionalidad ("homobifuncionales") o diferentes en funcionalidad ("heterobifuncionales"). El ejemplo mejor conocido de un reactivo homobifuncional es el bis-aldehído glutaraldehído, que reacciona con aminas (o hidrazidas). Puesto que la mayoría de las biomoléculas contienen múltiples aminas, el uso de glutaraldehído da como resultado habitualmente la formación de conjugados de peso molecular elevado. Además, la naturaleza polimérica de disoluciones de glutaraldehído, que puede variar considerablemente con la edad, significa que los conjugados preparados con glutaraldehído generalmente son bastante difíciles de reproducir.

50 Los reactivos heterobifuncionales generalmente se prefieren en la preparación de conjugados, puesto que permiten al operador ejercer un mayor grado de control sobre el proceso de conjugación. Una estrategia de conjugación heterobifuncional popular implica el acoplamiento de un grupo amino en una molécula (B) a un grupo sulfhidrilo libre (SH) en otra molécula (A) vía un reactivo heterobifuncional (X-Y) que tiene un resto reactivo con amina (X) y un resto reactivo con sulfhidrilo (Y). Un "espaciador" separa a menudo los restos reactivos del reactivo heterobifuncional; hay muchos reactivos heterobifuncionales que tienen estructuras espaciadoras variables, pero que comparten esencialmente la misma reactividad química.

Típicamente, una biomolécula (B) a conjugarse se hace reaccionar, vía sus grupos amínicos, con la funcionalidad X del reactivo heterobifuncional, dando como resultado un derivado B-Y. El reactivo heterobifuncional en exceso se elimina entonces, y B-Y purificado se hace reaccionar con grupos sulfhidrilo en la otra molécula (A). X es habitualmente un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), mientras que Y puede ser uno de varios restos. Y puede estar o no integrado en el conjugado AB final. El grupo sulfhidrilo derivado de A se incorpora casi siempre como un enlace de tioéter estable o como una mitad de un puente de disulfuro reversible (reducible) entre A y B. Y puede ser cualquier funcionalidad que reaccione con sulfhidrilo, incluyendo: maleimida, epóxido, yodoacetilo, bromoacetilo, piridilditiol, metanotiosulfonato, y similares.

Los ejemplos de reactivos heterobifuncionales reactivos con amina y con sulfhidrilo incluyen: 3-(2-piridilditiol)propionato de N-succinimidilo (SPDP); variantes de SPDP con espaciadores extendidos (LC-SPDP; LC = "cadena larga") y grupos sulfo para incrementar la solubilidad acuosa (sulfo-LC-SPDP); succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditiol)tolueno (SMPT); sulfo-LC-SMPT; 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC); sulfo-SMCC; éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS); sulfo-MBS; (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB); sulfo-SIAB; 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMBP); sulfo-SMBP; éster de N-(γ -maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBS); sulfo-GMBS; 6-((yodoacetil)amino)hexanoato de succinimidilo (SIAX); y su forma de espaciador extendido SIAXX; 4-(((yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SIAC); y su forma de espaciador extendido (SIACX); yodoacetato de p-nitrofenilo (NPIA). Hay muchos otros ejemplos relacionados, tales como el enlazador reactivo con carbonilo y con sulfhidrilo, hidrazida del ácido β -maleimidopropiónico (BMPH).

Los grupos sulfhidrilo en A pueden ser nativos. Sin embargo, más habitualmente, los grupos sulfhidrilo no están presentes, y es necesario introducirlos mediante una reacción de tiolación antes de la etapa de conjugación. En el caso de anticuerpos, los grupos tiol se pueden generar por medio de un agente reductor (por ejemplo MEA o ditiotreitól (DTT)), que rompen los puentes de disulfuro en diversas posiciones en la molécula del anticuerpo. Como alternativa, se conocen técnicas mediante las cuales se pueden modificar otros grupos funcionales (habitualmente aminas) para introducir un grupo sulfhidrilo libre o un grupo sulfhidrilo protegido, que entonces se puede desproteger mediante tratamiento con un agente reductor para generar un producto tiolado (es decir, A-SH). En las técnicas convencionales conocidas, antes de la conjugación con B-Y, es necesaria al menos una etapa de separación para separar el producto tiolado deseado A-SH de un reactivo de tiolación sin reaccionar, y cualesquiera subproductos que incluyan grupos sulfhidrilo libre que competirían por la conjugación a B-Y, y posiblemente también el agente reductor que de otro modo competiría con A-SH por la conjugación a B-Y. La separación se lleva a cabo mediante técnicas que incluyen la desalación en columnas de cromatografía, filtración en gel, diálisis, o lavado. La etapa o etapas de separación dan inevitablemente como resultado pérdidas y dilución de material. Debido a la naturaleza tediosa de la etapa o etapas de separación y/o al requisito de cantidades significativas de A, la etapa de tiolación puede que nunca se optimice a conciencia.

A título de ejemplo, 2-iminotiolano (2IT), que también es conocido como reactivo de Traut (Traut et al., *Biochemistry* 12, 3266-3273, 1973), se ha usado previamente para introducir grupos SH en proteínas, particularmente anticuerpos. El reactivo reacciona con aminas primarias (por ejemplo presentes en lisina) y genera un grupo sulfhidrilo terminal en una reacción de apertura de anillo. El reactivo de Traut en exceso se elimina, típicamente mediante desalación, antes de la conjugación de la molécula tiolada resultante con un grupo reactivo con tiol en otra molécula. Aunque no se menciona en trabajos de otro modo amplios sobre química de bioconjugación (por ejemplo *Bioconjugate. Techniques*; G.T. Hermanson, Academic Press 1996), 2IT también sufre una reacción secundaria en la que el tiol naciente reacciona intramolecularmente para formar un tioéster no reactivo (Bartlett y Busch., *Biol. Mass Spectrom.* 23, 353-356, 1994; Singh et al. *Anal. Biochem.* 236, 114-125, 1996). Está claro a partir de la química conocida del reactivo de Traut que la duración de la reacción de tiolación puede ser crítica para el éxito de la etapa de conjugación subsiguiente, y que es necesario que la desalación u otras etapas de separación se completen rápidamente.

Los usos previos convencionales de 2IT en la producción de conjugados con moléculas modificadas para contener funciones reactivas con tioles emplean 2IT en exceso seguido de una etapa de desalación, de diálisis o de lavado. Este tipo de enfoque es recomendado por los proveedores de 2IT (por ejemplo, boletín técnico de Pierce 0414; producto 26101) y de productos usados en la preparación de bioconjugados (por ejemplo Prozyme TechNote #TNPJ300). Otras publicaciones que describen este enfoque incluyen: patentes US 6962703, 6936701, 6669938, 6010902, 5869045, 5164311; Stanicic et al., *Infection and Immunity* 71, 5700-5713, 2003; Mandler et al., *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1573-1581, 2000; Huwyler et al., *Proc Natl Acad Sci* 93, 14164-14169, 1996.

Se sugirió una solución potencialmente prometedora al problema de la desalación (Haughland. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6ª edición, Molecular Probes, p49), que implicó la reducción del grupo sulfhidrilo protegido mediante TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina). Aunque se reivindica que la eliminación de TCEP es innecesaria, puesto que no interfiere con etapas de conjugación subsiguiente, Getz et al (*Anal Biochem* 273, 73-80, 1999) mostraron interferencia significativa de TCEP en reacciones de conjugación. Además, Shafer et al (*Anal Biochem* 282, 161-164, 2000) dieron a conocer que TCEP se combina rápidamente con los grupos maleimida y yodoacetilo reactivos con sulfhidrilo. Además, las reacciones de bioconjugación se llevan a cabo habitualmente en tampones de fosfato a pH 7-8, condiciones en las cuales TCEP es inestable (Han y Han, *Anal Biochem* 220, 5-10,

1994). TCEP es muy estable a pH extremos (por ejemplo, en HCl 100 mM o en NaOH 100 mM), que no son compatibles con la mayoría de las biomoléculas. Aunque TCEP ha encontrado ciertas aplicaciones nicho, sus serias limitaciones se han asegurado que los métodos preferidos para producir bioconjugados hayan cambiado poco desde que se hizo comercialmente disponible en 1992. TCEP no contiene un átomo de azufre, y por lo tanto, para los fines presentes, no se considera un "generador de tiol".

McCall et al (1990 *Bioconjugate Chem.* 1, 222-226) describieron un método de una etapa para conjugar quelantes macrocíclicos a anticuerpos usando 2IT. Especialmente, usaron 2IT para unir ácido 6-[p(bromoacetamido)bencil]-1,4,8,11-tetraazacilcotetradecano-N,N¹,N¹¹,N¹¹¹-tetracético, abreviado BAT, o un compuesto similar, ácido 2-[p(bromoacetamido)bencil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N¹,N¹¹,N¹¹¹-tetraacético, abreviado BAD), a un anticuerpo de ratón. Los reactivos BAT/BAD fueron monovalentes con respecto a grupos reactivos con sulfhidrilo, es decir, que tienen sólo un grupo por molécula capaz de reaccionar con un grupo sulfhidrilo. McCall et al sugirieron que el método de "una etapa" descrito allí fue aplicable solamente al reactivo particular BAT/BAD ("puesto que en condiciones levemente alcalinas los reactivos de bromoacetamida reaccionan rápidamente con grupos sulfhidrilo pero sólo lentamente con grupos amino, las disoluciones de anticuerpo, BAT y 2IT se podrían combinar en una única mezcla de reacción"). No hay sugerencia de que esta técnica puede ser generalmente aplicable, y el método estándar usado comercialmente sigue siendo un enfoque de 2 etapas con una etapa intermedia de desalación, purificación o lavado.

Sumario de la invención

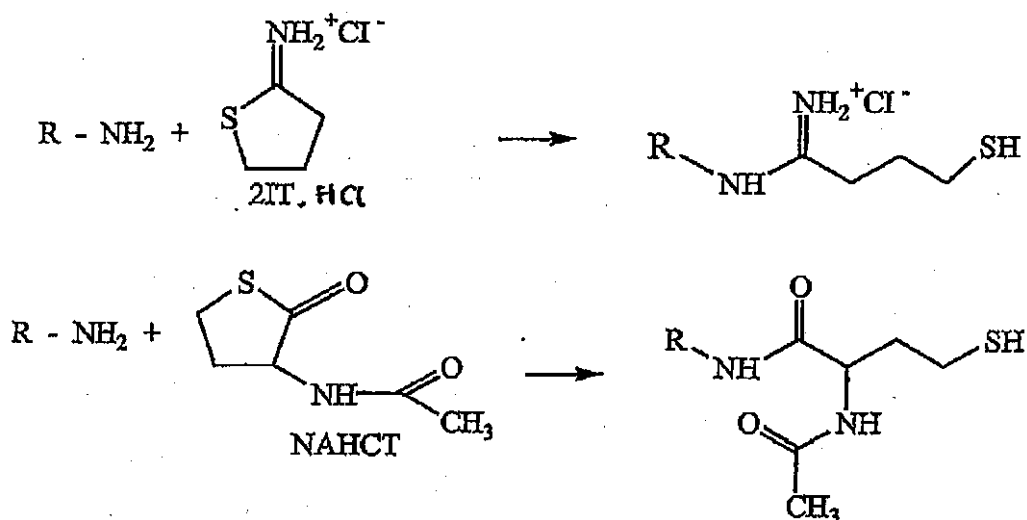
En un aspecto, la presente invención proporciona un método para hacer reaccionar una primera entidad química y una segunda entidad química para formar un conjugado según la reivindicación 1 de las reivindicaciones anejas aquí.

La presente invención difiere de técnicas convencionales de la técnica anterior por cuanto no está implicada ninguna etapa de separación entre la reacción del generador de tiol y la primera entidad química y la reacción con la segunda entidad química. En su lugar, en la presente invención, los tres materiales están simultáneamente en contacto en alguna etapa en el procedimiento de conjugación, actuando el generador de tiol para producir grupos sulfhidrilo libre en la primera entidad química mientras está en contacto con ambas entidades a conjugar. No hay ninguna separación o separación parcial de la primera entidad química tiolada del generador de tiol en exceso o de cualesquiera subproductos que se puedan formar antes del contacto con la segunda entidad química. Una ventaja de este enfoque es que los grupos SH recientemente formados, aunque lábiles, pueden reaccionar inmediatamente con la segunda entidad química.

La invención se basa en parte en la realización de que no es necesaria una etapa de separación, y que el uso consistente de separación en la técnica anterior se basa en una idea equivocada. Eliminando la etapa o etapas de separación de los procedimientos de conjugación anteriores, se simplifica sustancialmente el método de la invención. Además, debido a que no hay ninguna etapa de separación con pérdida inevitable de material, la reacción de conjugación de la invención se puede llevar a cabo usando cantidades muy pequeñas de materiales. De este modo, la invención allana el camino para la formación fácil de conjugados en forma de reactivos marcados útiles en ensayos directos, por ejemplo facilitando el marcaje directo de casi cualquier proteína, en cualquier escala, y ofrece beneficios adicionales de simplificación del inmunoensayo, mayor reproducibilidad y reducción de costes.

El generador de tiol (TG) contiene uno o más átomos de azufre, y reacciona con la primera entidad química (por ejemplo mediante apertura del anillo, transposición o de otro modo) para producir un grupo sulfhidrilo (o tiol) unido covalentemente en la primera entidad química, incluyendo el grupo sulfhidrilo un átomo de azufre procedente del generador de tiol. El generador de tiol comprende convenientemente una tiolactona (véase más abajo) y/o una iminotiolactona (véase más abajo) y/o un episulfuro tal como 1,2-epitiopropano y/o una tiazolidina tal como 2-[(4-dimetilamino)fenil]-1,3-tiazolidina y análogos N-sustituidos de tiazolidinas, en los que los mencionados N-sustituyentes se pueden introducir para modificar las propiedades de apertura del anillo (Canie et al., *Pure & Appl. Chem* 68, 813-818, 1996). Se puede usar una mezcla de materiales. Las tiolactonas adecuadas incluyen N-acetilhomocisteinotiolactona (NAHCT) (Benesch y Benesch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, 848-853, 1958). Las iminotiolactonas adecuadas incluyen 2-iminotiolano (2IT), también conocido como reactivo de Traut, que está comercialmente disponible como hidrocloreuro de 2-iminotiolano. También se pueden usar materiales sustituidos y derivatizados, por ejemplo 2-iminotiolano 5- y 4,5-alkilsustituido (Goff y Carroll. *Bioconjugate Chem.* 1, 381-386, 1990). Variantes posibles incluyen análogos 5-metil-; 5-terc-butil-; 5-fenil-; 5,5-dimetil-; 5-espiro-; y 4,5-anulares.

La primera entidad química (A) incluye una funcionalidad química que reacciona con el generador de tiol para producir una versión tiolada de A, A-SH. La funcionalidad es una amina, particularmente una amina primaria. Las reacciones de tiolación típicas son las siguientes:



2IT es completamente soluble en agua, y reacciona con aminas primarias en el intervalo de pH 7 a 10. En reacciones convencionales de formación de conjugados, 2IT se usa a un pH de alrededor de 8, en cuyas condiciones 2IT reacciona eficaz y rápidamente con aminas primarias, por ejemplo en restos de lisina presentes en péptidos, polipéptidos y proteínas. Para la reacción con aminas primarias, ahora se ha encontrado que es preferible hacer reaccionar 2IT a un pH menor que el valor convencional de 8. De este modo, cuando se usa 2IT, la reacción de conjugación se lleva a cabo preferiblemente a un pH menor que 8, preferiblemente menor que 7,8, y más preferiblemente menor que pH 7,7. Un intervalo de pH preferido es 7,0-7,5. Puesto que las reacciones de los tioles con muchos tipos de grupos Y reactivos con tioles tienen lugar eficientemente entre pH 6,5 y 7,5, es indeseable usar TG a valores elevados de pH en los que reacciones de hidrólisis competitivas generan tioles libres indeseables. Además, Y también puede estar sujeto a reacciones de hidrólisis a pH alcalino, como se discute más abajo, o puede mostrar selectividad reducida por tioles, como en el caso del grupo funcional popular maleimida.

La primera entidad química (generalmente denominada aquí "A") es un anticuerpo o un multímero de un anticuerpo. Una primera entidad química que comprende uno o más grupos tiol se puede representar como A-SH.

15 Cuando la primera entidad química incluye más de una funcionalidad química que reacciona con TG, por ejemplo varias aminas primarias, se formarán más de un grupo sulfhidrilo en la primera entidad química.

La segunda entidad química (generalmente denominada aquí "B") incluye una pluralidad de grupos funcionales (Y) reactivos con sulfhidrilo, que reaccionan con el grupo sulfhidrilo formado en la primera entidad química, dando como resultado la producción del conjugado. La segunda entidad química puede así representarse típicamente como B-Y. Durante la reacción de conjugación, el átomo de azufre de A-SH se integra habitualmente en el conjugado final como un enlace de tioéter estable o una mitad de un puente de disulfuro reversible (reducible).

La segunda entidad química incluye más de un grupo funcional reactivo con sulfhidrilo, que puede tener químicas idénticas o diferentes. Las entidades reactivas con sulfhidrilo incluyen maleimida, epóxido, yodoacetilo, bromoacetilo, piridilolliol, etc. La pluralidad de grupos funcionales (Y) reactivos con sulfhidrilo puede estar presente de forma natural en la segunda entidad química, pero normalmente será necesario que se introduzca uno o más de los grupos funcionales reactivos con sulfhidrilo en una molécula B en una etapa preliminar para producir la segunda entidad química. Las técnicas de introducción adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica.

La segunda entidad química (B-Y) comprende o incluye una enzima o fibroilproteína fluorescente, típicamente para la identificación o medida de materiales vía la unión de la primera entidad química conjugada.

30 La presente invención proporciona un método que es generalmente aplicable.

En una realización preferida, la segunda entidad química comprende una enzima. Los ejemplos de enzimas preferidas incluyen HRP, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa. Se prefiere especialmente HRP.

Las funciones de las entidades químicas primera y segunda se pueden invertir.

35 Puesto que los tioles que no se originan de la reacción entre A y TG pueden competir con moléculas de A-SH por el número limitado de funciones Y en B, hay ciertas restricciones en el intervalo de condiciones de conjugación que se pueden emplear. La pureza inicial de los reactivos, especialmente de TG, es una consideración importante, ya que esto es una fuente potencial de tioles libres indeseados (por ejemplo productos de hidrólisis de TG). El incremento del pH de la reacción de conjugación tenderá a desprotonar aminas en A, dando una reacción más rápida de aminas

con TG, pero también se puede incrementar la velocidad de hidrólisis de TG. La eficiencia de la conjugación dependerá por lo tanto, como cualquier reacción química, de las concentraciones de agentes reaccionantes, pero también del nivel inicial de contaminación tiólica, de la velocidad de producción de A-SH (a partir de una reacción de A con TG) en comparación con la de otros tioles, de la reactividad relativa de las diferentes moléculas que contienen tiol con B-Y, y de la cantidad total de funciones Y disponibles para la conjugación.

Se ha descubierto que las conjugaciones de moléculas de la fórmula B-Y_n (en la que "n" es un número entero) con A-SH serán más susceptibles a la interferencia de tioles contaminantes a medida que "n" se hace más pequeño. Si n = 1, la reacción de una molécula de B-Y con solamente una molécula de tiol libre contaminante evitará que la molécula de B-Y particular participe en cualesquiera otras reacciones de acoplamiento. De este modo, si "n" es pequeño, se puede requerir un gran exceso de B-Y para asegurarse de que cada molécula de A-SH pueda reaccionar con B-Y. El uso de B-Y en exceso puede ser poco práctico y no económico, particularmente si B es una biomolécula grande. Además, los niveles elevados de B libre en el conjugado final pueden ser problemáticos en ciertas aplicaciones. En su lugar, se ha observado que un método mejorado para preparar conjugados a pesar de reacciones de competición indeseables con tioles indeseados fue incrementar la eficiencia de la conjugación entre A-SH y B-Y_n usando reactivos B-Y con valores elevados de "n".

El método de la presente invención se hace crecientemente robusto a medida que aumenta el valor de "n". Preferiblemente, la segunda entidad química comprende más de tres grupos reactivos con sulfhidrilo por molécula. Más preferiblemente, la segunda entidad química comprende cinco o más grupos reactivos con sulfhidrilo por molécula. Lo más preferible, la segunda entidad química comprende diez o más grupos reactivos con sulfhidrilo. Ventajosamente, la segunda entidad química comprende de diez a quince grupos reactivos con sulfhidrilo. Si el número deseado de grupos reactivos con sulfhidrilo no es naturalmente inherente a la segunda entidad química, se pueden introducir mediante síntesis química o enzimática, como se describe en otra parte. Para los presentes fines, un "grupo reactivo con sulfhidrilo" es aquel que reaccionará con un grupo sulfhidrilo bajo las condiciones de la reacción de conjugación. Claramente, las condiciones de reacción deben ser tales como para preservar sustancialmente la actividad de las entidades químicas primera y segunda.

En el caso de HRP, que sólo tiene seis restos de lisina, de los cuales sólo se pueden explotar dos para la introducción de funciones Y (Bioconjugate Techniques 1996, GT Hermanson, p632), es particularmente importante que los reactivos tengan un bajo contenido de tiol, y que las condiciones de reacción no conduzcan a la hidrólisis excesiva de TG. Sin embargo, independientemente de las condiciones usadas, cualquier reducción en la eficiencia de la conjugación que surja de la producción de tioles libres indeseados se puede contrarrestar introduciendo más grupos Y en B o polimerizando B-Y, o mediante una combinación de estos dos enfoques. El método usado para introducir grupos Y extra en B no está particularmente limitado; no obstante, el método debería preferiblemente preservar sustancialmente la actividad biológica de B, particularmente si B es una enzima.

Una ventaja de la presente invención es que evita la necesidad de emplear grandes relaciones molares de segunda entidad química a generador de tiol (es decir, la relación B:TG) para superar la presencia de tioles libres interferentes. De este modo, en la presente invención, la relación molar de la segunda entidad química a generador de tiol en la reacción de conjugación es convenientemente no mayor que 2,0:1, típicamente 1:1 o menos, preferiblemente en el intervalo 1:1 a 1:20, lo más preferible en el intervalo 1:10 a 1:15.

Los grupos Y se pueden unir directamente a grupos funcionales que ya están presentes en B. Como alternativa, o además, se pueden introducir nuevos centros reactivos. Por ejemplo, las moléculas con cadenas de azúcares se pueden oxidar con peryodato de sodio para generar funciones aldehído. Estas funciones reaccionan fácilmente con compuestos que contienen amina o hidrazida para formar bases de Schiff o enlaces de hidrazona, respectivamente, que se pueden estabilizar con cianoborohidruro de sodio, borohidruro de sodio u otro agente reductor adecuado. De este modo, si se hace reaccionar un exceso de un compuesto de diamina con grupos aldehídos, se introducirá un resto amínico por cada aldehído que se modifique. Si la diamina no está presente en exceso, se pueden producir reacciones de reticulación (es decir, para dar un polímero B), que puede ser útil en ciertas situaciones (véase más abajo).

La introducción de grupos amina en B no está limitada a la reacción de B con diaminas simples. Se pueden emplear otras moléculas con dos (o más) grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales debe ser capaz de reaccionar con B, y debe ser posible convertir el otro grupo funcional en un grupo Y. Los grupos Y también se pueden introducir directamente en B sin utilizar ningún resto amínico en B. Por ejemplo, si B es una glucoproteína, la reacción con peryodato genera funciones aldehído que se pueden hacer reaccionar subsiguientemente con un reactivo heterobifuncional que tiene tanto grupos aldehído como grupos reactivos con sulfhidrilo (por ejemplo hidrazida del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico; MPBH) (Chamow SM et al J. Biol. Chem. 1992 267, 15916-22). También se pueden usar compuestos análogos a MPBH (por ejemplo M₂C₂H) (Bioconjugate Techniques 1996, GT Hermanson, p250).

Otro método para introducir grupos funcionales es modificar ácidos carboxílicos (por ejemplo como se proporciona mediante restos de glutamato o aspartato en cadenas polipeptídicas). La condensación mediada por carbodiimida de moléculas que contienen amina con ácidos carboxílicos se emplea ampliamente en síntesis química, y se puede usar para introducir aminas (por ejemplo mediante reacción con diaminas, triaminas) y otros grupos funcionales en

B. Por ejemplo, se ha generado HRP aminada usando condensación mediada por carbodiimida (EDC) de HRP con etilendiamina (documento US 5.039.607), que dio moléculas de HRP con 11 funciones amínicas. El enfoque de carbodiimida es particularmente útil si no se pueden emplear métodos a base de peryodato por la falta de cadenas de azúcares en B.

5 Una ventaja de introducir aminas en B seguido de la conversión subsiguiente en funciones Y es que hay comercialmente disponible un amplio intervalo de moléculas que contienen amina potencialmente útiles. En estas moléculas, los grupos amina se pueden unir o no al mismo átomo. Al incrementar en B el número de aminas (que finalmente se pueden convertir en grupos Y), se pueden generar derivados de HRP que son más resistentes a la interferencia del tiol en reacciones de conjugación.

10 En una realización preferida, HRP activada con peryodato se hace reaccionar con una molécula C que posee "c" grupos amina (en el que c = 2 o más), proporcionando análogos de HRP con c-1 aminas adicionales por cada grupo aldehído modificado. En una realización preferida, C es una diamina (por ejemplo etilendiamina, propanodiamina, butanodiamina; 2,2'(etilendioxi)bis-etilamina (EDBA); lisina y similar) o moléculas con tres o más funciones amina (por ejemplo lys-lys (c = 3), trilisina (c = 4), Jeffamina T403 (c = 3), dextranos aminados, dendrímeros aminados u
15 otras especies poliamínicas.

Una estrategia alternativa para reducir el impacto sobre la eficiencia de la conjugación de tioles libres indeseados es inducir la polimerización de B-Y, que proporciona un polímero [(B)n]q con nq funciones maleimida, en el que "n" es el número de funciones Y por molécula de B en el polímero, y "q" es el número medio de moléculas B en un polímero. De este modo, incluso en situaciones en las que "n" es pequeño, el impacto de los tioles libres se reduce debido a
20 que las moléculas B están físicamente conectadas y la conjugación de A-SH a una cualquiera de las funciones Y disponibles a todas las moléculas B en el polímero a A. Otra ventaja de este enfoque es que se puede incrementar la sensibilidad de la detección puesto que potencialmente se puede unir a A un número más grande de, por ejemplo, moléculas de HRP. El uso de HRP polimérica en inmunoensayos para incrementar la sensibilidad del ensayo es bien conocido, y tales formas están comercialmente disponibles.

25 Como alternativa, las moléculas B (en lugar de B-Y) con aminas libres (ya sea de origen natural o introducidas por ejemplo mediante reacción con diaminas) se pueden polimerizar en primer lugar mediante reacción con agentes de reticulación homobifuncionales (por ejemplo dialdehídos) o mediante uso de reactivos heterobifuncionales para promover el acoplamiento de aminas a otros grupos funcionales en B. Los heteropolímeros también se pueden generar mediante reacción de B con moléculas de "armazón" (por ejemplo dendrímeros, dextranos, proteínas) a los
30 que se pueden anexar múltiples moléculas B. Esto puede implicar reacciones de aminas en B con aldehídos en el armazón o con otros grupos funcionales disponibles (por ejemplo tioles) mediado por reactivos de reticulación heterobifuncionales. A su vez, las funciones amínicas de las superficies sin reaccionar que quedan se pueden convertir en grupos Y mediante reacción con un reactivo heterobifuncional tal como SMCC. Si tras la etapa de polimerización quedan aminas libres insuficientes, se pueden anexar otras aminas antes de la introducción de los grupos Y. Por ejemplo, si se usa la química de carbodiimida para introducir aminas en B, las cuales se utilizan entonces, o se utilizan parcialmente, en reacciones de polimerización, se puede usar una química diferente (por
35 ejemplo activación de cadenas de azúcares mediante peryodato) para introducir aminas adicionales (que entonces se pueden convertir en grupos Y), o para introducir grupos Y directamente (por ejemplo mediante reacción con MPBH). HRP polimerizada también se puede obtener a partir de fuentes comerciales, y se puede modificar posteriormente para crear múltiples funciones Y para uso en la presente invención.

Las moléculas B que confieren propiedades útiles en conjugados se preparan a menudo y se almacenan en forma de B-Y para uso posterior. Por ejemplo, algunos marcadores están comercialmente disponibles como derivados
45 activados por maleimida (enzimas liofilizadas activadas por maleimida, o derivados de maleimida o de yodoacetilo de pequeñas moléculas fluorescentes). B-Y también se puede preparar recientemente si se requiere usando métodos conocidos en la técnica. B incluyen enzimas tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, y glucosa oxidasa (Gox); y moléculas fluorescentes tales como ficobiliproteínas (por ejemplo alofococianina, ficoeritrina). Las enzimas HRP y fosfatasa alcalina son marcadores enzimáticos ampliamente usados especialmente para anticuerpos y otros polipéptidos, y estas enzimas representan ejemplos preferidos de la segunda entidad química.

50 Cuando se pone en práctica la invención, A, TG y B-Y se combinan y se incuban durante un período de tiempo adecuado. El orden de adición se puede variar para adecuarse a las circunstancias.

Por ejemplo, en un enfoque, en una primera etapa, TG se mezcla con A. Después de un período de tiempo adecuado durante el cual se genera A-SH, en una segunda etapa, la mezcla se añade a B-Y. Un período de tiempo
55 adecuado es cualquier tiempo que produzca una conjugación eficiente entre A y B-Y. El período es típicamente hasta 18 horas (es decir, toda la noche), pero se puede llevar a cabo en alrededor de 2-4 h en condiciones óptimas. Las condiciones de reacción en las dos etapas de reacción se pueden variar si es apropiado, por ejemplo las etapas primera y segunda se pueden llevar a cabo a diferentes valores de pH mediante uso de tampones apropiados.

En otro enfoque, A se mezcla con B-Y, después de lo cual la mezcla se pone en contacto con TG.

En un enfoque adicional, TG se mezcla con B-Y, y la mezcla se pone en contacto después con A.

De forma deseable, ya sea uno o ambos de TG y B-Y están inicialmente en condición seca, por ejemplo secándolos por congelación o liofilizándolos para su estabilidad durante el almacenamiento. Preferiblemente, para reconstituir los otros componentes se usa una disolución (típicamente acuosa) de la primera entidad, lo que conduce a la expansión mínima del volumen de la muestra.

En una realización particularmente preferida, A se añade en forma líquida a una mezcla liofilizada que comprende tanto B-Y como TG.

Como alternativa, una mezcla liofilizada de TG y B-Y se reconstituye con un disolvente (típicamente agua) para dar una mezcla que no contiene A, a la que se añade subsiguientemente A.

La disolución en la que tiene lugar la reacción de conjugación puede incluir opcionalmente uno o más componentes además de A, B-Y y TG. Estos componentes pueden afectar o no a la velocidad de la reacción de conjugación. Por ejemplo, algunos aditivos se pueden introducir antes de la liofilización de los componentes, principalmente con el fin de estabilizar dichos componentes o por la facilidad de disolución. Se pueden emplear otros componentes, especialmente tampones, principalmente para proporcionar condiciones de pH en las que las reacciones preferidas tienen lugar a una velocidad adecuada. Estos tampones se pueden introducir en la mezcla de conjugación final vía una o más adiciones, de manera que la mezcla final tenga la composición requerida. Preferiblemente, aunque no obligatoriamente, las sustancias tamponantes se incluyen junto con uno o más de los otros componentes (A, B-Y o TG, o una combinación de los mismos), para minimizar la cantidad de trabajo a la hora de preparar el conjugado.

La estabilidad de TG y las condiciones requeridas para efectuar la conjugación se deberían considerar cuidadosamente cuando se determina el orden preferido de adición de los componentes a la mezcla de reacción. Por ejemplo, TG lábil a bases se puede almacenar en medio ácido (o liofilizado a partir de tal medio), y se puede introducir el último en una mezcla de reacción adecuadamente tamponada. La mezcla tamponada se puede diseñar para ajustar el ácido introducido junto con TG y proporcionar un pH final y la composición que sea adecuada para que tenga lugar la reacción de conjugación pretendida.

Las condiciones adecuadas de, por ejemplo, temperatura, pH y concentración para la reacción de conjugación dependerán de la naturaleza de los reactivos. Las condiciones adecuadas se pueden determinar fácilmente por aquellos de pericia en la técnica por medio de un ensayo y error habitual.

El método de la presente invención también proporciona la base de un kit de conjugación. TG y B-Y se proporcionan como componentes secos, por ejemplo secados por congelación (liofilizados), ya sea separadamente o como una mezcla, en vasijas adecuadas, junto con opcionalmente un tampón adecuado en el que se puede disolver A. Como alternativa, A se puede desalar o dializar en el mencionado tampón, particularmente si la formulación de A contiene componentes que pueden interferir con la reacción de conjugación.

En un aspecto adicional, la invención proporciona así un kit de conjugación para uso en el método de la invención, siendo el kit como se define en la reivindicación 12 de las reivindicaciones anejas aquí.

El kit comprende de forma deseable muestras de la segunda entidad química y del generador de tiol.

Estos dos reactivos se pueden proporcionar separadamente, o pueden estar en forma de una mezcla. El generador de tiol está presente preferiblemente en exceso en relación con la segunda entidad química, por ejemplo un exceso molar de hasta alrededor de 20 veces.

Una pluralidad de alícuotas o muestras de reactivos o mezclas de reactivos se proporciona preferiblemente en recipientes adecuados, por ejemplo en tubos individuales, viales, o en los pocillos de una placa de microtitulación de múltiples pocillos (por ejemplo 96 pocillos). Las muestras se pueden proporcionar en un intervalo de cantidades predeterminadas diferentes, de forma que un usuario puede seleccionar el tamaño de muestra apropiado que tenga con respecto al material (por ejemplo primer componente) a tratar. Una realización preferida comprende una pluralidad de muestras de mezclas de la segunda entidad química y del generador de tiol en un intervalo de diferentes cantidades para uso en la conjugación con una o más entidades químicas primeras diferentes (posiblemente suministradas por un usuario final), por ejemplo para el marcaje de un intervalo de diferentes moléculas, por ejemplo anticuerpos a usar en inmunoensayos directos.

Las muestras de reactivo o mezclas de reactivos pueden incluir opcionalmente otros materiales tales como tampones, etc., para proporcionar condiciones apropiadas para la reacción.

Cuando el generador de tiol comprende 2IT, las muestras de 2IT están preferiblemente a un pH por debajo de 8, más preferiblemente por debajo de 7,8, y aún más preferiblemente por debajo de 7,7. Un intervalo preferido de pH es 7,0-7,5.

El kit puede incluir ingredientes opcionales tales como disolvente, disoluciones tampón, etc.

Las muestras de reactivo están en forma seca, por ejemplo secadas por congelación (liofilizadas), para la estabilidad

durante el almacenamiento. De forma deseable, las muestras de reactivo se liofilizan a partir de una disolución acuosa que comprende tampón de fosfato de sodio a un pH en el intervalo de 5-6,5, preferiblemente 5,0-6,0. De forma deseable, también las muestras de reactivo se liofilizan a partir de una disolución acuosa que comprende iones Mg^{2+} , especialmente a una concentración en el intervalo 1-10 mM de Mg^{2+} . También pueden estar presentes crioprotectores y lioprotectores convencionales, tales como polioles, especialmente trehalosa o dextrano.

En una realización preferida, los reactivos liofilizados se proporcionan en pequeños tubos de polipropileno (por ejemplo tubos Eppendorf de 0,5 ml o 1,5 ml), crioviales o viales de polipropileno, viales de vidrio, microplacas de polipropileno o de poliestireno de 96 pocillos, y otros receptáculos de tamaño apropiado para la reacción de conjugación pretendida. Preferiblemente, el material de la vasija no reacciona significativamente con TG para liberar grupos tiol antes de la liofilización o con la reconstitución subsiguiente con un disolvente adecuado. La naturaleza de la vasija no está particularmente limitada a los ejemplos mencionados anteriormente.

Los componentes tamponantes adecuados para uso en la presente invención incluyen tampones de fosfato, especialmente fosfato de sodio, ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), bicarbonato y otros tampones que no reaccionan con TG, o reaccionan de forma relativamente lenta cuando se comparan con la velocidad de reacción de TG con grupos funcionales en A. La lista puede contener por lo tanto tampones que contienen amina, que reaccionan a una velocidad adecuadamente lenta.

Otros componentes de la mezcla de la reacción de conjugación pueden incluir sales (por ejemplo NaCl) y otros componentes inorgánicos u orgánicos que no participan directamente en las reacciones pero proporcionan un entorno adecuado que estabiliza componentes o de alguna otra manera facilitan las reacciones deseadas o minimizan pérdidas, por ejemplo, en las superficies de las vasijas.

Puesto que TG es reactivo, puede reaccionar con otros nucleófilos en la mezcla de conjugación. El agua es un nucleófilo débil, pero está presente en una concentración elevada y las reacciones de hidrólisis podrían incrementar la concentración de tioles no asociados covalentemente con A, especialmente a valores de pH significativamente por encima de pH 7.

Preferiblemente, el TG incluye pocos o ningún grupo tiol libre, estando adecuadamente el nivel por debajo de 5% en términos molares, preferiblemente por debajo de 3% en términos molares, y más preferiblemente por debajo de 1% en términos molares.

TG procedente de fuentes comerciales puede contener cantidades significativas de tiol libre, y los tioles libres también se pueden generar durante un período de tiempo en el almacenamiento. Los tioles libres podrían competir con A-SH por los grupos Y en B-Y, y reducir la eficiencia de la conjugación. En el caso de 2-iminotiolano, un proveedor señala que la contaminación con tioles libres es "hasta 5%". Los lotes usados para el trabajo descrito aquí se midieron a un contenido de tiol de alrededor de 1% en términos molares.

Se prefiere que las relaciones molares de los agentes reaccionantes se seleccionen cuidadosamente de manera que pequeñas cantidades de tioles libres posiblemente presentes en TG no impacten significativamente sobre la eficiencia de la conjugación. El reactivo de Traut es más estable que otras moléculas que se usan para introducir tioles o tioles protegidos, y no es necesario usarlo en un gran exceso molar. Algunos reactivos heterobifuncionales reactivos con amina que tienen grupos NHS tienen semividas cortas en disoluciones acuosas, y se usan en gran exceso para compensar la hidrólisis rápida. Típicamente, TG se usa en exceso razonable, por ejemplo un exceso molar de 10 veces con respecto a la funcionalidad química relevante tal como aminas presentes en la primera entidad química, para estar seguros de que todas las moléculas de la primera entidad química están tioladas. Sin embargo, a la hora de seleccionar una concentración adecuada de TG, el usuario debe valorar la probable velocidad de reacción, que está influida por el pH de la disolución. Una concentración adecuada de TG a un pH fijo se determina fácilmente examinando el efecto de la variación de la concentración de TG sobre el comportamiento de los conjugados resultantes. Se prefiere que las condiciones de reacción permitan la tiolación eficiente de A, pero que se evite la tiolación excesiva para no dañar la actividad biológica de A. Igualmente, cantidades excesivas de la segunda entidad química no se deberían conjugar a A-SH, ya que de otro modo esto puede conducir a un comportamiento del conjugado por debajo del óptimo. La segunda entidad química está presente típicamente en un exceso modesto, por ejemplo un exceso molar de hasta alrededor de 5 veces, en relación con la primera entidad química tiolada, para estar seguros de que las primeras entidades químicas están conjugadas. Después de la reacción, los materiales en exceso se pueden eliminar mediante cualesquiera técnicas adecuadas.

Usando métodos mostrados en la presente invención, una reacción de conjugación puede contener justamente 10 μg de un anticuerpo IgG (Mr 150.000). Típicamente, se introducen alrededor de 5 grupos tiol por molécula. De este modo, en un volumen de 10 μl (6,7 μM de anticuerpo), la concentración de aminas (a modificar) es $\sim 33 \mu\text{M}$. Puesto que no hay ninguna etapa de desalación, los tioles nacientes reaccionarán inmediatamente con B-Y. Para un marcador tal como HRP activado por maleimida (peso molecular 40.000), el marcaje de todos los tioles nacientes requeriría $\sim 33 \mu\text{M}$ de enzima, que corresponde a $\sim 13 \mu\text{g}$ de HRP en un volumen de reacción de 10 μl . Si se usa un exceso molar de 25 veces de TG, una contaminación tiólica del 1% en la disolución de TG representaría una concentración de alrededor de 8 μM , o 1/4 (en términos molares) de la HRP presente activada por maleimida.

Además, si HRP se marcarse de media con 2 o más grupos Y por molécula, la reacción de una molécula de HRP con un tiol libre contaminante no evitaría necesariamente que la molécula se conjugase con B-Y. Se concluye a partir de esto que el uso de B-Y en exceso, o B-Y con múltiples grupos Y, puede mejorar los efectos negativos de tioles libres contaminantes y de aquellos generados por la hidrólisis de TG durante la reacción de conjugación. En algunas aplicaciones, especialmente aquellas con antígeno inmovilizado sobre una superficie, el uso de B-Y en exceso no es problemático, ya que el reactivo sobrante (es decir, no enlazado a A) se puede simplemente eliminar por lavado durante el inmunoensayo. Además, es habitual usar B-Y en exceso para minimizar la cantidad de A-SH sin reaccionar, que competiría con AB y reduciría la sensibilidad del ensayo.

En algunas aplicaciones de inmunoensayos, especialmente aquellas en las que el antígeno se mide en disolución libre, puede ser deseable maximizar la cantidad de B conjugado y minimizar B-Y libre. Esto se puede lograr mediante purificación de AB a partir de la mezcla de conjugación usando métodos conocidos en la técnica, o mediante el control cuidadoso de las condiciones de reacción. En la presente invención, la evitación de las etapas de desalación, de las cuales es difícil determinar el rendimiento de los materiales, especialmente cuando existe la necesidad de progresar rápidamente hasta la etapa de conjugación, ayuda enormemente a establecer relaciones precisas de los agentes reaccionantes y a optimizar las condiciones para satisfacer los objetivos experimentales específicos.

El nivel de tioles libres se hace más importante si la concentración de B-Y libre necesita mantenerse baja, puesto que los tioles indeseados pueden hacer que B, y especialmente B que está ligeramente decorado con Y (es decir, el valor de n es $B-Y_n$ es bajo, por ejemplo 1 o casi 1), sea incapaz de conjugarse a A-SH. Cuando la separación de B-Y libre tras la conjugación sea difícil o indeseable, es preferible minimizar reacciones secundarias usando condiciones (es decir, pH bajo, tampones libres de amina) que no provoquen liberación de tiol no dependiente de A.

Los tioles libres se pueden eliminar o se pueden eliminar en gran cantidad antes de que se use TG con el fin de tiolar A. Por ejemplo, los tioles libres se pueden eliminar mediante purificación usando un soporte sólido para el que TG y la forma de tiol libre muestran afinidades diferentes, permitiendo así la elución selectiva de TG relativamente puro. La unión al soporte sólido puede ser covalente o no covalente.

En un enfoque, una disolución de TG se pone en contacto con un soporte sólido al que se han unido grupos Y. Tales materiales están comercialmente disponibles, como en forma de yodoacetil Sepharose (Pierce) (Sepharose es una marca comercial), o se pueden obtener usando métodos conocidos en la técnica (J. Biol. Chem. 245 3059-3065 (1970) mediante conjugación de haloacetatos, mediada por carbodiimida, a perlas de agarosa que portan amina. En una realización preferida, el número de grupos Y supera el número de tioles libres, de manera que el soporte sólido es capaz de capturar todos, o sustancialmente todos, los tioles libres indeseados vía un enlace covalente. El TG que no se une al soporte sólido se usa preferiblemente de forma inmediata o se congela rápidamente y se liofiliza para conservar el material mucho tiempo en un estado intacto.

Otro enfoque es medir la concentración de tiol libre en muestras de TG, por ejemplo usando el método bien conocido de 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB), u otro método adecuado para medir tioles libres. Entonces se añade una disolución que contiene una molécula que posee Y y que carece de grupos funcionales que pueden interferir con las etapas de conjugación subsiguientes, preferiblemente en un ligero exceso molar, y preferiblemente en condiciones en las que (a) no se generan más tioles, o se generan muy lentamente, (b) los tioles contaminantes reaccionan rápidamente con Y para formar un tioéter estable, eliminando así tioles de la muestra. Por supuesto, esta estrategia se puede usar para eliminar tioles independientemente de su fuente.

La molécula que posee Y está en contacto adecuadamente con TG durante un período de tiempo que permite que la mayoría del tiol libre reaccione con Y. Después del mencionado período de tiempo, la muestra de TG se pone en contacto con A y B-Y. La molécula usada para eliminar tioles libres puede ser una de las siguientes: N-etilmaleimida, yodoacetamida, yodoacetato, bromoacetamida, bromoacetato, cloroacetato, compuestos de mercurio, y similares. Se prefiere particularmente N-etilmaleimida.

Al poner en contacto al mismo tiempo A, TG y B-Y, según la invención, se le puede dar a TG la oportunidad de reaccionar con aminas que están presentes en B-Y, así como A. Si B es una biomolécula grande, es bastante probable que todavía estén presentes aminas libres, incluso si los grupos Y ya se han introducido vía modificación química de aminas disponibles. En el caso de HRP, un marcador muy popular en la química de bioconjugados, el número de aminas por molécula es inusualmente bajo (0,15 por kDa), en comparación con 0,88/kDa para seroalbúmina bovina (BSA) y 0,44/kDa para ovoalbúmina. De este modo, el grado de reacción de TG con B-Y se puede controlar variando (i) el tipo de B usado, (ii) la densidad de grupos Y en B (con respecto a aminas libres residuales), (iii) el orden de adición de los reactivos.

Cuando el nivel de aminas en B es elevado y, en las condiciones experimentales usadas, se produce una reacción significativa con TG, B se puede polimerizar parcialmente (es decir, reacción de B-Y con B-SH naciente). Cuando esto se considera indeseable, la adopción simplemente de una estrategia de conjugación de dos etapas evitará el problema. En primer lugar, TG entra en contacto con A y, después de un período de tiempo adecuado en el que se genera A-SH, la mezcla se pone en contacto con B-Y. Esto permite que se formen los conjugados AB antes de que se generen cantidades significativas de polímero de B.

La polimerización parcial de B-Y puede ser ventajosa en algunas situaciones. Un enfoque simple para incrementar la sensibilidad del inmunoensayo es unir más B por molécula de A. La polimerización de B-Y se ha usado para lograr esta meta. Mediante la selección cuidadosa de las concentraciones de reactivos (TG, A) y la duración de la primera etapa (producción de A-SH), y la consideración del número de aminas libres y grupos Y en B, se puede manipular el grado de producción de polímero de B *in situ* según se requiera.

Aunque el método de conjugación de una etapa de la presente invención es excepcionalmente atractivo, con todos los reactivos combinados juntos en una única etapa, las variantes de dos etapas (por ejemplo, que implican operaciones de adición de dos reactivos en lugar de una) todavía son notablemente simples en comparación con los métodos de conjugación mayoritariamente presentes, y tienen el beneficio de proporcionar opciones adicionales, si se requiere, para optimizar conjugados para aplicaciones específicas.

Por ejemplo, en una realización, una reacción se monta en condiciones que favorecen la producción de conjugados AB (a partir de A-SH y B-Y). En una reacción separada, B se hace reaccionar con TG para generar una disolución que contiene B-SH, que entonces se añade a los complejos AB previamente formados, que pueden contener grupos Y sin reaccionar. Introduciendo B-SH, se puede obtener un incremento controlado en el peso molecular del conjugado a través de un revestimiento de B-SH sobre moléculas de AB-Y. Mediante la consideración cuidadosa de la entrada de B-Y y la densidad de los grupos Y, el conjugado inicial se puede manipular para que reaccione en grados variables con moléculas de B-SH.

Algunas aplicaciones pueden requerir conjugados de un tamaño molecular relativamente bajo. Las aplicaciones que implican penetración de reactivos en una muestra que contiene antígenos (por ejemplo inmunohistoquímica) normalmente funcionarán mejor con conjugados de bajo peso molecular. Sin embargo, si el antígeno se deposita y se expone en una superficie (por ejemplo nitrocelulosa, como la transferencia western), puede mostrar una mayor sensibilidad con un conjugado de mayor peso molecular. De este modo, una consideración del uso pretendido determina el enfoque preferido para desarrollar el conjugado.

En la preparación de inmunoconjugados usando estrategias a base de tiol, es habitual emplear una etapa de "bloqueo" al final de la reacción de conjugación, para eliminar cualesquiera tioles no usados. En algunos casos, esta etapa no se requiere realmente, pero se lleva a cabo como una cuestión rutinaria. En la presente invención, es improbable que exista alguna necesidad de una etapa de bloqueo si TG es 2-iminotiolano, ya que los tioles implicados en el acoplamiento son autolimitantes debido a la reacción intramolecular secundaria. Sin embargo, puesto que la reacción de apertura del anillo debe preceder a cualquier decaimiento vía la reacción intramolecular secundaria, o vía estrategias de bloqueo de tiol convencionales, se puede utilizar una simple etapa de desactivación para acelerar la apertura del anillo de TG en exceso.

El método más rápido para detener la conjugación y desactivar TG es añadir un nucleófilo (Nu), por ejemplo glicina, en un tampón adecuado. La velocidad de desactivación es una función del pH y del tipo y concentración de Nu; las condiciones empleadas para desactivar TG deben ser compatibles con el conjugado y preferiblemente la aplicación en la que se usará el conjugado, de otro modo se requerirá una etapa de purificación. Los tioles liberados a partir de TG de esta manera reaccionarán intramolecularmente o con grupos Y en exceso en B-Y o AB-Y. De este modo, la adición de Nu puede desactivar tanto TG como, indirectamente, grupos Y. Puesto que los tioles liberados pueden formar un enlace covalente con AB, es necesario considerar cuidadosamente la elección de Nu para no introducir grupos indeseados derivados de Nu (por ejemplo sustituyentes voluminosos) al conjugado. Sin embargo, el tratamiento de la mezcla con un tiol de bajo peso molecular (por ejemplo mercaptoetanol) antes de la apertura del anillo de TG se puede llevar a cabo para desactivar grupos Y si se requiere.

Las reacciones de conjugación se terminan convenientemente mediante adición de Nu, por ejemplo glicina, para atacar TG en exceso, y también mediante adición de un reactivo que bloquee al tiol (TBR), tal como N-etilmaleimida, que se emplea normalmente en química de bioconjugados para este fin específico. Sin embargo, la combinación de glicina como Nu y N-etilmaleimida como TBR no pretende ser limitante, y muchos otros materiales Nu y bloqueadores de tiol posibles serán manifiestos para un experto en la técnica.

En una realización preferida, Nu y TBR se introducen secuencialmente. Preferiblemente, Nu se añade antes de TBR. Preferiblemente, TBR se añade en un ligero exceso con respecto a los tioles libres liberados. El nivel de tiol libre se puede determinar, por ejemplo, con DTNB. Cuando el nivel de tiol no se puede medir, TBR se añade en ligero exceso con respecto al nivel conocido de TG, puesto que el nivel de tiol no puede exceder la concentración inicial de TG, si TG es la única fuente de tiol libre.

En una realización, la mezcla de conjugados se pone en contacto simplemente con Nu (por ejemplo 50 mM de glicina en tampón de fosfato o disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 8,0). Opcionalmente, la mezcla se puede suplementar adicionalmente con reactivos que bloquean el tiol (por ejemplo N-etilmaleimida), estabilizantes (por ejemplo BSA, ovoalbúmina u otros componentes proteínicos; glicerol) y reactivos antimicrobianos (por ejemplo azida sódica) u otros conservantes. El conjugado se puede almacenar a 4°C, o en pequeñas alícuotas congeladas a -20°C, o en forma líquida a -20 (es decir, con glicerol al 50%) o congelado a -70°C, dependiendo de la naturaleza del conjugado y de su estabilidad a la temperatura y sensibilidad a la congelación-descongelación.

Los métodos de la presente invención enseñan cómo se pueden obtener los conjugados usando química heterobifuncional probada, pero sin las etapas de desalación problemáticas que incrementan el trabajo y limitan su aplicación a componentes que están disponibles en cantidades relativamente grandes. Los experimentos de tiolación múltiples se pueden llevar a cabo usando cantidades pequeñas de material, y el comportamiento del conjugado se puede optimizar rápidamente y de forma eficaz con respecto al coste. Los métodos descritos en la presente invención se prestan fácilmente a la automatización. Por ejemplo, la exploración de 96 condiciones de tiolación diferentes en una placa de microtitulación se consideraría directa usando la tecnología robótica actual. La optimización de los procedimientos de tiolación en esta escala sería completamente impracticable en procedimientos que impliquen etapas de desalación o de diálisis.

Una de las aplicaciones principales de la presente invención es el marcaje de anticuerpos primarios. Puesto que los reactivos de anticuerpos existentes pueden haber sido formulados sin considerar el marcaje directo, puede estar presente un número de aditivos que incluyen agentes antimicrobianos, tales como azida sódica, y estabilizantes tales como BSA o glicerol. Además, el tampón de almacenamiento del anticuerpo puede no ser uno de los tampones preferidos para las reacciones de conjugación. En otros casos, el anticuerpo se puede proporcionar como una muestra bruta de suero congelado o fluido ascítico.

Para muestras que contienen aditivos tales como BSA u otras proteínas derivadas de fluidos animales, incluyendo sustancias procedentes de procesos de cultivo tisular (por ejemplo suero fetal de ternera), el anticuerpo puede ser un componente minoritario y difícil de marcar selectivamente. Afortunadamente, los métodos para purificar anticuerpos son bien conocidos, e incluyen cromatografía de afinidad bioespecífica sobre una matriz soporte a la que se ha unido el antígeno. Otros métodos adecuados incluyen matrices soporte con proteína acoplada A, proteína G, y similares, que se pueden usar para purificar IgG a partir de mezclas complejas al aprovechar interacciones con regiones Fc de IgGs de mamíferos. El tampón de elución se debería seleccionar cuidadosamente para facilitar las reacciones de conjugación subsiguientes. Por ejemplo, en cromatografía de afinidad, la elución se lleva a cabo a menudo usando un tampón de pH bajo (por ejemplo, glicina pH 2,3), lo que no sería adecuado, al menos no si el material se tuviese que añadir directamente a la mezcla de conjugación. Entre tampones de pH bajo, los más preferibles incluyen citrato/ácido cítrico y aquellos basados en mezclas de HCl/NaCl.

Otro enfoque para eliminar sustancias tales como BSA es la cromatografía sobre una resina, tal como Blue-Sepharose (Amersham). La ventaja de este enfoque es que el anticuerpo pasa a través de la resina y no se expone a tratamiento con pH bajo, lo que podría dañar a algunos anticuerpos. Recientemente se ha puesto disponible a la venta un nuevo producto, Melon (Melon es una marca comercial) gel de Pierce, que aparentemente elimina un amplio intervalo de proteínas de muestras de anticuerpos. Sin embargo, los métodos sustractivos tales como estos no eliminan sustancias indeseadas de bajo peso molecular.

Los métodos que implican la purificación del anticuerpo de interés mediante la unión a un antígeno o proteína sobre una matriz soporte tienen la ventaja de que todas las moléculas indeseadas son eliminadas por lavado. Cuando la elución a pH bajo no se puede usar para interrumpir la interacción anticuerpo:antígeno, quizá debido al riesgo de daño a uno de los componentes, se puede usar una estrategia de elución alternativa, tal como elución hipotónica (por ejemplo Gee y Kenny, Biochem J. 230, 753-764, 1985).

Se han ejemplificado una variedad de aplicaciones, y muestran que la invención permitirá que se marquen fácilmente anticuerpos primarios y otros reactivos, que generalmente son caros y disponibles para los investigadores en pequeñas cantidades. Esto probablemente dé como resultado un uso mucho mayor de métodos de detección directos, que tienen un número de ventajas con respecto a otros métodos indirectos de detección de antígenos.

Para evitar dudas, se señala aquí explícitamente que cualquier característica descrita aquí como "preferida", "deseable", "conveniente", "ventajosa", o similar, se puede emplear en la invención de forma aislada, o en combinación con una cualquiera o más características adicionales así descritas, excepto que el contexto dicte otra cosa.

La invención se describe adicionalmente, a título de ilustración, en los siguientes Ejemplos que se refieren a las figuras que se acompañan, en las que:

la Figura 1 es una gráfica de barras de la absorbancia frente a la concentración de 2IT, que muestra los resultados de ELISA de conjugados Ab1-HRP según se ensayan en el Ejemplo 4;

la Figura 2 es una gráfica de la absorbancia frente al pH, que muestra el efecto de la variación del pH sobre la eficiencia de la conjugación como se ensaya en el Ejemplo 5;

la Figura 3 es una gráfica de la absorbancia frente al pH, que muestra el óptimo del pH para la conjugación Ab1-GOX según se ensaya en el Ejemplo 6;

la Figura 4 es una gráfica de barras de la absorbancia para diversos tampones diferentes, que muestra el efecto del tipo de tampón sobre la eficiencia de la conjugación como se ensaya en el Ejemplo 7;

la Figura 5 es un par de gráficas de la absorbancia frente a pH para tampón de fosfato y tampón Tris como se

ensaya en el Ejemplo 8;

la Figura 6 es una gráfica de la absorbancia frente al tiempo, que muestra el transcurso de tiempo de la formación del conjugado como se ensaya en el Ejemplo 9;

5 la Figura 7 es una gráfica de barras de la absorbancia para diferentes muestras, que muestra el efecto de la variación del orden de adición de reactivos como se ensaya en el Ejemplo 10;

10 la Figura 8 es una gráfica de la absorbancia (unidades arbitrarias, 405 nm) frente a la dilución del conjugado (escala logarítmica), que muestra el comportamiento en un ELISA de dos lotes diferentes de conjugados EDDBA-HRP-IgG (círculos negros y círculos blancos) en comparación con aquel de un conjugado OLA-HRP-IgG (cuadrados). Los datos del control generados con una placa de microtitulación libre de antígenos están superpuestos sobre la línea base.

La Figura 9 es una gráfica de la absorbancia (unidades arbitrarias, 405 nm) frente a la dilución del conjugado (escala logarítmica), que muestra el comportamiento en un ELISA de conjugados EDDBA-HRP-Ig preparados a pH 6,5 (círculos blancos), pH 7,0 (círculos negros), pH 7,5 (cuadrados) o pH 8,0 (triángulos).

15 La Figura 10 es una gráfica de la absorbancia (unidades arbitrarias, 405 nm) frente a la dilución del conjugado (escala logarítmica), que muestra el comportamiento en un ELISA de un conjugado EDDBA-Gox-Ig (círculos negros) y un conjugado OLA-Gox-Ig (círculos blancos).

La Figura 11 es una gráfica de la absorbancia (unidades arbitrarias, 405 nm) frente a la dilución del conjugado (escala logarítmica), que muestra el comportamiento en un ELISA de un conjugado EDDBA-HRP-Ig activado con yodoacetilo (los datos para el control están superpuestos sobre la línea base).

20 La Figura 12 es una gráfica de barras de la absorbancia (405 nm) frente a la relación en peso de Ig a mal-EDDBA-HRP (barras negras sólidas) o mal-OLA-HRP (barras grises sombreadas).

La Figura 13 es una gráfica de la absorbancia frente al tiempo, que muestra la liberación de tiol a partir de 2IT por diversas aminas como se ensaya en el Ejemplo 17;

25 la Figura 14 es una gráfica similar a la Figura 13, que muestra la captura de tiol usando DTNB como se ensaya en el Ejemplo 18; y

la Figura 15 es una gráfica de la absorbancia (405 nm) frente al factor de dilución del conjugado, que muestra la capacidad de los reactivos liofilizados para formar conjugados activos en ELISA tras el almacenamiento a diferentes temperaturas.

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1

HRP (5 mg) (Sigma, P6782) (B) en 0,5 ml de fosfato de sodio 100 mM, pH 7,2, se activó con sulfo-SMCC (4 mM) (Pierce, 22322) durante 1 hora a 25°C. La HRP activada por maleimida ("mal-HRP") (B-Y) se desaló en una columna PD10 (Amersham Biosciences) equilibrada con 10 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pH 7,03. La proteína activada (2,5 mg/ml) se usó inmediatamente o se liofilizó.

35 Ejemplo 2

Glucosa oxidasa (5 mg) (Biozyme G03B3) en 0,5 ml de 100 mM de fosfato de sodio, pH 7,2, se activó con sulfo-SMCC (2 mM) durante 30 min. a 25°C. La Gox activada por maleimida (mal-Gox) se desaló y se procesó como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

40 IgG de conejo (Sigma I5006) se disolvió a 1 mg/ml en disolución salina tamponada con Tris (TBS) (50 mM de Tris/150 mM de NaCl, pH 8,0) y se almacenó en pequeñas alícuotas a -70°C. Para preparar placas de ELISA revestidas, la IgG se descongeló y se diluyó en TBS hasta 20 µg por ml. Se incubaron placas Nunc maxisorb (claras, 96 pocillos) (código 071832) con 50 µl (1 µg) de IgG por pocillo. Las placas se revistieron durante > 1 hora a temperatura ambiente, y después se envolvieron en papel de aluminio y se transfirieron a 4°C para el
45 almacenamiento. Las placas revestidas se usaron dentro de 10 días. Inmediatamente antes del uso, las placas se bloquearon con TBS/0,1% de BSA, pH 8,0, durante > 30 min. Para ensayar los conjugados mediante ELISA, se incubaron pocillos duplicados o triplicados con 50 µl de conjugado, adecuadamente diluido en TBS/0,1% de BSA. Después de 60 minutos a 25°C, las placas se lavaron cinco veces con TBS. Se añadió un sustrato adecuado (véase más abajo), y la absorbancia se determinó después de 2 ó 10 minutos a una longitud de onda apropiada
50 (dependiendo del marcador usado) usando un contador de múltiples marcadores Victor3 modelo 1420 (Perkin Elmer). La actividad de HRP se midió usando 1 mM de sustrato de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) en 50 mM de acetato de sodio, pH 5,0, que contiene 1 µl de H₂O₂ por ml de reactivo. La actividad

de Gox se midió en un sistema de ensayo acoplado usando 100 mM de acetato de sodio, 100 mM de glucosa, pH 5,0, que contiene HRP (50 µg/ml) y 2 mM de ABTS. La actividad de fosfatasa alcalina se midió usando 5 mM de fosfato de para-nitrofenilo (PNPP) en 50 mM de tampón de glicina, pH 9,6, que contiene 1 mM de MgCl₂ y 0,5 mM de ZnSO₄.

5 Ejemplo 4

Anticuerpo liofilizado anti-IgG de conejo (1 mg) (Sigma R2004) ("Ab1") se resuspendió en 1 ml de 150 mM de NaCl, y se almacenó a 4°C. Se prepararon los siguientes lotes de 2-iminotiolano (2IT) en 1,2 mM de HCl: 1000 mM, 100 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM y 0,01 mM de Ab1 (A), mal-HRP (B-Y) (preparada como se describe en el Ejemplo 1) y tampón (100 mM de fosfato de sodio, 1 mM de EDTA, pH 7,4), combinados en una relación 1:1:2, y se dispensaron porciones de 20 µl en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Los tubos recibieron 5 µl de 2IT (TG), para dar concentraciones finales de 2IT de 200 mM (C7), 20 mM (C8), 2 mM (C9), 0,2 mM (C10), 0,02 mM (C11) y 0,002 mM (C12). Un tubo de control (neg) recibió 1,2 mM de HCl en lugar de 2IT. "Pos" es un anticuerpo de control positivo, diluido 1/1000 (Sigma A6667). Después de 90 minutos, las muestras C7-C12 se diluyeron con TBS/0,1% de BSA y se ensayaron mediante ELISA usando el procedimiento del Ejemplo 3 a una dilución (con respecto a Ab1 sin diluir) de 1/200. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Como se puede observar en la Figura 1, hay una dependencia con forma de campana de la absorbancia frente a la concentración de 2IT. A bajas concentraciones de 2IT, este efecto se explica probablemente por la tiolación insuficiente de Ab1, para permitir la conjugación eficiente. A concentraciones elevadas, el efecto se explica probablemente por el daño de Ab1 a través de la modificación excesiva de los grupos de lisina, aunque son posibles otras explicaciones. Por ejemplo, 2IT comercialmente disponible está contaminado con un pequeño porcentaje de tioles libres, que podrían competir con Ab1 tiolado por la reacción con mal-HRP a concentraciones elevadas de 2IT. Hay poca absorbancia en la ausencia de 2IT (neg). Los valores de la absorbancia para los pocillos de control son bajos (<0,1), excepto para C7 (~0,25). Los datos obtenidos para los pocillos de control (sin antígeno revestido) se restaron de los datos obtenidos para los pocillos revestidos con antígeno, para dar los valores mostrados en la Figura 1. Este experimento muestra que es posible combinar 2IT, Ab1 y mal-HRP en un único tubo y generar conjugados activos.

Ejemplo 5

El efecto de la variación del pH sobre la eficiencia de la conjugación se examinó usando una serie de tampones de fosfato preparados mezclando 0,2M de Na₂HPO₄ y 0,2M de NaH₂PO₄ en proporciones variables: 10:0 (tampón P1, pH 9,29); 9:1 (tampón P2, pH 7,72); 4:1 (tampón P3, pH 7,38); 7:3 (tampón P4, pH 7,14); 3:2 (tampón P5, pH 6,94), 1:1 (tampón P6, pH 6,75), 2:3 (tampón P7, pH 6,58); 3:7 (tampón P8, pH 6,39); 1:4 (tampón P9, pH 6,12); 1:9 (tampón P10, pH 5,81); 0:10 (tampón P11, pH 4,29). Ab1 (preparado como se describe en el Ejemplo 4) y mal-HRP (2,5 mg/ml) (procedente del Ejemplo 1; liofilizado reconstituido con agua) se mezclaron 1:1, y se dispensaron alícuotas de 20 µl en tubos Eppendorf. Cada tubo recibió entonces tampón (uno de P1-P11) (20 µl) seguido de 10 µl de 5 mM de TG (es decir, concentración final 1 mM). Después de 60 minutos, se añadieron 950 µl de TBS/0,1% de BSA, pH 8,0, y las muestras se analizaron mediante ELISA usando placas revestidas con IgG de conejo (véase el Ejemplo 3). Los resultados se muestran en la Figura 2.

Como se puede observar en la Figura 2, los conjugados activos se pudieron producir bajo una amplia variedad de condiciones, y sólo en los extremos de pH las reacciones fueron más bien ineficientes. De forma interesante, el pH óptimo (~7) está sustancialmente por debajo del pH usado típicamente para tiolación de biomoléculas con 2IT. Un pH de 8,0 o superior se usa actualmente de forma habitual, que tiende a desprotonar aminas e incrementar la velocidad de reacción con 2IT. Sin embargo, para la tiolación *in situ* con 2IT en presencia de una molécula activada por maleimida, estas condiciones no son claramente óptimas. Esto se puede explicar por la mayor hidrólisis de las funciones de maleimida en mal-HRP a mayores valores de pH, y/o por una mayor hidrólisis de 2IT. Cualquiera de estos dos procesos reduciría la eficiencia de las reacciones de conjugación entre mal-HRP y Ab1 tiolado.

Ejemplo 6

Se examinó el efecto de la variación del pH sobre la eficiencia de la conjugación usando mal-GOX, como se describe en el Ejemplo 5, excepto que los volúmenes de las muestras se redujeron a la mitad y las reacciones se terminaron mediante adición de 975 µl de TBS/0,1% de BSA. Las muestras se analizaron mediante ELISA usando placas revestidas con IgG de conejo (Ejemplo 3). Los resultados se muestran en la Figura 3.

Como se puede observar, el óptimo del pH para conjugar Ab1 y Gox fue similar al observado para el marcaje de HRP (Ejemplo 5).

Ejemplo 7

Se examinó el efecto de la variación de la especie del tampón a un valor fijo de pH de 7,4. El tampón (200 mM) y Ab1 se mezclaron 1:1 y se dispensaron alícuotas de 10 µl en tubos Eppendorf, seguido de 5 µl de 2,5 mg/ml de mal-HRP (Ejemplo 1) y 5 µl de 5 mM de 2IT. Las reacciones de los controles se montaron con 1,2 mM de HCl en lugar

de 2IT. La concentración final de cada tampón (Tris, HEPES o fosfato de sodio) fue 50 mM. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Como se puede observar en la Figura 4, las conjugaciones en presencia de tampón de fosfato o de HEPES produjeron conjugados que mostraron un comportamiento similar mediante ELISA. A pesar del exceso molar de 40 veces de Tris con respecto a 2IT, el valor de la absorbancia para el conjugado preparado en presencia de Tris se redujo en solamente un factor de ~2. Se observaron valores bajos de la absorbancia si se omitió 2IT. En un experimento análogo separado, un conjugado preparado a pH 7,0 en tampón MOPS dio resultados de ELISA similares a un conjugado preparado usando tampón de fosfato de sodio al mismo pH (no mostrado). De este modo, las reacciones de conjugación se pueden llevar a cabo en varios tampones que carecen de funciones amina, e incluso en presencia de Tris con una pérdida modesta de comportamiento. Este efecto de Tris se explica probablemente por la apertura del anillo de 2IT inducida por amina (véase el Ejemplo 8) y la competición entre los tioles libres generados y Ab1 tiolado por mal-HRP.

Ejemplo 8

Se exploró el efecto del pH sobre la liberación de tioles a partir de 2IT usando una serie de tampones de fosfato o de tampones Tris. Se mezclaron 90 μ l de muestras de cada tampón con 10 μ l de 100 mM de 2IT, y se incubaron alícuotas duplicadas (20 μ l) en una microplaca clara durante 45 min. a 25°C. Se añadieron 200 μ l de DTNB (procedente de un lote 80 μ g/ml en 200 mM de fosfato de sodio, 1 mM de EDTA, pH 8,0), y las placas se leyeron a A_{405} después de 1 minuto. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Como se puede observar en la Figura 5, con el tampón de fosfato, la liberación de tiol se hace más notable a medida que aumenta el pH, lo que se puede atribuir a la hidrólisis de 2IT. Un valor de pH de pH 8 o mayor se usa a menudo actualmente para la tiolación de biomoléculas con 2IT. A pH bajo, 2IT es muy estable. Para cualquier valor de pH fijo, la velocidad de producción de tiol es mayor en presencia de Tris en comparación con aquella en presencia de fosfato, lo que es consistente con los resultados en el Ejemplo 7, que mostraron eficiencia reducida de la conjugación en presencia de Tris.

Ejemplo 9

Se examinó la velocidad de formación de conjugado en tampón de fosfato a tres valores de pH diferentes. 50 μ l de reacciones comprendieron 10 μ l de Ab1 (Ejemplo 4), 20 μ l de tampón, 10 μ l de mal-HRP (Ejemplo 1) (2,5 mg/ml) y 10 μ l de 1 mM de 2IT. A puntos de tiempo específicos (5 min., 20 min., 60 min. y 2 h), se extrajeron muestras de 5 μ l y se diluyeron 1/200 en TBS/0,1% de BSA antes del ensayo mediante ELISA con placa revestida con IgG de conejo (Ejemplo 3). Los resultados se muestran en la Figura 6.

Como se puede observar en la Figura 6, la velocidad de producción del conjugado depende del pH. Se observa un incremento constante en la absorbancia con el tiempo para las incubaciones a pH 6,39 y pH 7,14 a lo largo de las primeras cuatro horas y dos horas, respectivamente. La velocidad inicial de incremento en la absorbancia es la mayor a pH 8,15, pero la velocidad se ralentiza después de 20 minutos y el valor de la absorbancia para la incubación a pH 7,14 supera el de la incubación a pH 8,15 después de 1 hora. Finalmente, el valor de la absorbancia para la incubación a pH bajo también excedió aquel para la incubación a pH 8,15 (datos no mostrados).

Ejemplo 10

Se mezclaron (1:1) HRP (2,5 mg/ml) y tampón (P4; Ejemplo 5) (muestras 1 a 4), o Ab1 (Ejemplo 4) y tampón P4 (muestras 9 a 6), y se mezclaron porciones de 10 μ l con 5 μ l de 2IT (1 mM) mediante adición escalonada de 2IT a -30 min., -15 min., -5 min. y -1 min., con respecto al tiempo = 0 min., punto en el cual se añadieron cualesquiera materiales pendientes (Ab1 o mal-HRP). Esto permitió en una mitad del experimento la formación de Ab1 tiolado antes de la adición de mal-HRP, y en la otra mitad, la polimerización potencial de mal-HRP antes de la introducción de Ab1. Se generó una muestra de referencia (tubo 5) con la adición concurrente de Ab1 y HRP a 2IT en el tiempo = 0 min. Después de otros 60 min. de incubación, se añadieron 975 μ l de TBS/0,1% de BSA, y las muestras se ensayaron mediante ELISA usando una placa revestida con IgG de conejo (Ejemplo 3). Los resultados se muestran en la Figura 7.

Como se puede observar en la Figura 7, los conjugados, aunque no necesariamente idénticos físicamente, dieron todos ellos valores de absorbancia muy similares mediante ELISA, lo que sugiere que el orden de adición no es crítico en este experimento particular. De forma importante, la capacidad para combinar mal-HRP y 2IT durante períodos de tiempo significativos sin los efectos negativos sugiere que los dos se pueden combinar fácilmente y liofilizar, a fin de permitir un procedimiento de conjugación de una etapa simple en el que se usa una disolución de la molécula a marcar para reconstituir la mezcla liofilizada.

Ejemplo 11 (Preparación de enzimas modificadas con EDDBA y modificadas con etanolamina)

Se añadieron 160 μ l de peryodato de sodio (0,1M) a 2 ml de HRP (12,5 mg/ml en 0,1M de fosfato de sodio pH 7,2) y se incubó en la oscuridad durante 25 min. a 25°C. El aldehído-HRP resultante se desaló en Sephadex G-25 para

eliminar el peryodato en exceso, y se hizo reaccionar con 2,2'(etilendioxi)bis-etilamina ("EDBA", concentración final en volumen de 1%) en 0,5M de bicarbonato de sodio, pH 9,2. Después de 1 h a RT, se añadió cianoborohidruro de sodio a 50 mM (procedente de un lote 5M), para estabilizar las bases de Schiff. Después de 1 h adicional, la muestra de HRP modificada con EDBA se desaló en 0,1M de fosfato de sodio pH 7,2 y se ajustó a 5 mg/ml.

5 También se modificaron porciones de HRP con etanolamina (que genera hidroxilos terminales en lugar de aminas) usando esencialmente el mismo procedimiento para proporcionar material de control, OLA-HRP. HRP modificada con EDBA y con OLA contenía típicamente 13 y 2 aminas reactivas con TNBS, respectivamente (es decir, proporcionó moléculas B-Y_n en las que el valor de n fue, respectivamente, 13 y 2). Se prepararon derivados análogos de glucosa oxidasa (Gox) usando el mismo procedimiento.

10 HRP modificada con EDBA y con OLA (5 mg/ml) se activó con maleimida usando 4 mM de sulfo-SMCC (como se describe en el Ejemplo 1) para generar mal-EDBA-HRP y mal-OLA-HRP, respectivamente. Las muestras se desalaron en tampón débil (10 mM de fosfato de sodio, pH 7,2) para facilitar el ajuste subsiguiente del pH mediante adición de disoluciones de tampón más concentradas.

15 En algunos experimentos, se llevaron a cabo reacciones de activación análogas en EDBA-HRP usando 4 mM de éster succinimidílico del ácido yodoacético para introducir yodoacetilo en lugar de funciones maleimida en HRP.

Ejemplo 12 (Comparación de mal-EDBA-HRP y mal-OLA-IBZP en reacciones de conjugación)

20 Mal-EDBA-HRP (preparada a partir de dos lotes diferentes de EDBA-HRP, y mal-OLA-HRP (procedente del Ejemplo 11) (10 µl; 25 µg) se conjugaron cada una con 2 µl de anti-IgG de conejo de cabra 5 mg/ml (en 200 mM de Hepes, pH 7,5) y con 1,3 µl de 8 mM de TG1. Después de cuatro horas a 25°C, las muestras se diluyeron hasta 1 ml con TBS/0,1% de BSA, a partir de lo cual se prepararon diluciones en serie y se ensayaron en ELISA usando una placa revestida con IgG de conejo o una placa de control (sin IgG de conejo). Los resultados se muestran en la Figura 8.

25 Las curvas de titulación para conjugados derivados de mal-EDBA-HRP fueron muy similares entre sí, con valores de OD en exceso de 1,5 a una dilución de 1/10.000. Por el contrario, el conjugado preparado con la mal-OLA-HRP requirió una concentración mayor de ~10 veces para lograr valores de absorbancia similares. Los datos para la placa de control (es decir, sin antígeno) están superpuestos entre sí, y muestran lecturas de línea base a lo largo de todo el intervalo de diluciones ensayadas. De este modo, la estrategia de introducir más funciones amina antes de la activación con maleimida potencia significativamente el comportamiento de conjugados en ELISA.

Ejemplo 13 (Evaluación del óptimo de pH para conjugaciones con mal-EDBA-BRP)

30 Mal-EDBA-HRP (10 µl) preparada como se describe anteriormente se mezcló con 5 µl de anti-IgG de conejo de cabra 2 mg/ml (20 mM de fosfato de sodio/150 mM de NaCl), 2 µl de TG1 (8 mM) y 3 µl de uno de los siguientes tampones 1M: MOPS pH 6,5, MOPS pH 7, Hepes pH 7, o EPPS pH 8). Tras la incubación toda la noche a 25°C, se prepararon diluciones en serie y se ensayaron en ELISA usando una placa revestida con IgG de conejo o una placa de control (sin IgG de conejo). Los resultados se muestran en la Figura 9.

35 Se observó un óptimo de pH muy amplio en reacciones con mal-EDBA-HRP (pH 6,5-7,5), siendo solamente el conjugado preparado a pH 7 marginalmente mejor que aquellos preparados a pH 6,5 o pH 7,5. De este modo, la adición de funciones maleimida extras tiene el efecto de hacer a las reacciones de conjugación más robustas frente a cambios en el pH, en comparación con reacciones llevadas a cabo con HRP no tratada con diamina (compárese con el Ejemplo 5).

Ejemplo 14 (Comparación de mal-EDBA-Gox y mal-OLA-Gox en reacciones de conjugación)

La aplicabilidad del tratamiento con EDBA a la hora de potenciar el comportamiento de los conjugados se ilustra adicionalmente con glucosa oxidasa, que tiene naturalmente más aminas disponibles que HRP. No obstante, la oxidación con peryodato, acoplada con el tratamiento con EDBA, produce conjugados que son sustancialmente mejores que los conjugados del control (tratados con etanolamina), en los que cuelgan hidroxilos en vez de aminas.

45 Se prepararon los conjugados EDBA-Gox-Ig y OLA-Gox-Ig, y se ensayaron en un ELISA, como se describe en los Ejemplos 11 y 12. Los resultados se presentan en la Figura 10.

Ejemplo 15 (Reacciones de conjugación con yodoacetil-HRP)

50 Yodoacetil-EDBA-HRP (preparada como se describe en el Ejemplo 11) (10 µl; 25 µg) se conjugó con 2 µl de anti-IgG de conejo de cabra 5 mg/ml (en 200 mM de Hepes, pH 7,5) y con 1,3 µl de 8 mM de TG1. Después de la incubación durante toda la noche (~16 horas) en la oscuridad a 25°C, el conjugado se diluyó hasta 1 ml con TBS/0,1% de BSA, a partir de lo cual se prepararon diluciones en serie y se ensayaron en ELISA usando una placa revestida con IgG de conejo o una placa de control (sin IgG de conejo). Los resultados se muestran en la Figura 11.

Esto ilustra que los métodos de la presente invención no están limitados a reacciones de tipo adición electrófila como se ejemplifican mediante maleimidadas, sino también reacciones de desplazamiento con derivados de

haloacetilo.

Ejemplo 16 (Efecto de la variación de la relación Ab:enzima)

Se mezcló mal-EDBA-HRP o mal-OLA-HRP (10 μ l; 25 μ g) con 10 μ l de anti-IgG de conejo de cabra de concentración variable (en 200 mM de Hepes, pH 7,5) y 2 μ l de TG1 (8 mM). Después de una incubación durante 4 h a 25°C, las muestras se diluyeron hasta 250 ng de anticuerpo por ml y se ensayaron en ELISA usando una placa revestida con IgG de conejo o una placa de control (sin IgG de conejo). Los resultados se presentan en la Figura 12.

Como se puede observar en la Figura 12, a todas las relaciones de anticuerpo:HRP, los conjugados preparados con mal-EDBA-HRP muestran valores de absorbancia mucho mayores que aquellos preparados con mal-OLA-HRP. Los valores de absorbancia son ligeramente menores con relaciones elevadas de anticuerpo a HRP, presumiblemente debido a que el número de moléculas de HRP unidas no puede exceder 2 por molécula de anticuerpo (relación en peso 2:1 = relación molar \sim 1:2), mientras que se pueden unir mayores números con relaciones más bajas de anticuerpo a HRP. De este modo, los conjugados de menor peso molecular, que pueden ser ventajosos en aplicaciones que requieran la penetración en tejidos (por ejemplo, como en inmunohistoquímica), están favorecidos por relaciones más elevadas de anticuerpo:HRP.

Es manifiesto a partir de la Figura 12 que el incremento de la relación de mal-OLA-HRP a Ab (reduciendo la cantidad de anticuerpo en cada reacción) tiene sólo un efecto modesto sobre el comportamiento del conjugado. Incluso con un exceso sustancial de mal-OLA-HRP (16:1 en peso; relación molar de \sim 64:1), la eficiencia de la conjugación nunca se aproxima a aquella observada con mal-EDBA-HRP. Puesto que la velocidad de producción de anticuerpo tiolado a cualquier relación fija de Ab-HRP es la misma con ambos tipos de HRP, algún otro proceso debe de estar funcionando para limitar la eficiencia de la conjugación en el caso de mal-OLA-HRP en exceso. Si consideramos el caso más general de A que reacciona con B-Y, TG1 reacciona con aminas en A para generar A-SH. También reacciona con agua en una reacción de hidrólisis de competición, que va más deprisa al incrementar el pH, especialmente por encima de pH 7, para generar tioles libres indeseados.

En la Figura 12, puesto que un gran exceso de mal-OLA-HRP da conjugados que muestran claramente un comportamiento por debajo del óptimo, la concentración de tioles libres indeseados debe alcanzar un punto crítico (es decir, en el que la eficiencia de la conjugación se ve comprometida) antes de que todas las moléculas de Ab-NH₂ se hayan convertido en Ab-SH. En el ejemplo, la concentración de generador de tiol (TG) es 800 μ M. La concentración del agente reaccionante amínico es \sim 6 μ M (es decir, para 1 mg/ml de anticuerpo), o efectivamente 60 μ M de amina (asumiendo que alrededor de 10 lisinas son capaces de reaccionar con TG). En el caso de mal-OLA-HRP, la concentración de funciones maleimida no puede ser en ningún caso mayor que el contenido inicial de aminas antes del tratamiento con SMCC, y por lo tanto no es mayor que \sim 50-100 μ M. Aunque las aminas son más nucleófilas que las moléculas de agua a valores de pH fisiológicos, las concentraciones de los agentes reaccionantes y del disolvente (es decir, agua) son desfavorables en reacciones de conjugación típicas.

De este modo, incrementar simplemente la relación de HRP a Ab no es suficiente para vencer a reacciones de competición indeseables. Tiene que haber suficientes maleimidias para hacer frente a una liberación más rápida de tiol libre (es decir, hidrólisis de TG) que la producción de A-SH en la reacción de conjugación. Aunque las aminas en A son más reactivas que los grupos hidroxilo de las moléculas de agua, existe una concentración muy elevada de agua (55 M) para atacar a TG. Esto subraya por qué HRP multivalente es especialmente eficaz, ya que puede reaccionar con tioles indeseados que se generan durante la reacción de conjugación de 2-3 horas, y aún reacciona todavía con A-SH.

Ejemplo 17

Para investigar diversas aminas como agentes de paralización potenciales que se pueden usar, si se requiere, para detener reacciones de conjugación, se examinó la liberación de tiol a partir de 2IT usando el ensayo de DTNB estándar. Se prepararon disoluciones 5 mM de glicina, etanolamina, o 1,3-diaminopropano (DAP) en 100 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 7,4. Se mezclaron alícuotas de 980 μ l de cada tampón con 20 μ l de 100 mM de 2IT en 1,2 mM de HCl. El reactivo DTNB recientemente preparado (200 μ l de una disolución 80 μ g/ml en 100 mM de fosfato de sodio, 1 mM de EDTA, pH 8,0) se añadió a alícuotas de 20 μ l de cada mezcla de reacción a lo largo de un curso de tiempo. Las muestras se leyeron en 1 minuto de adición de DTNB. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Las amina que se seleccionaron, etanolamina, glicina y DAP, contienen adicionalmente grupos neutros, ácidos y básicos, respectivamente. Es importante señalar que los datos en la Figura 14 representan potencialmente el efecto neto de dos rutas opuestas, (i) la liberación de tiol a partir de 2IT y (ii) la reacción intramolecular de tiol liberado. Esto es particularmente evidente con glicina, en la que la cantidad de tiol comienza a caer después de una hora. La velocidad "aparente" más elevada se da con DAP, pero a pesar de su función amina extra en comparación con glicina o etanolamina, parece que no explica la mayor liberación de tiol (véase el Ejemplo 18) sino más bien una reacción intramolecular más lenta, lo que quizá esté conectado con la carga positiva extra que se introduce en el producto de la reacción de apertura del anillo inicial.

Ejemplo 18

Para apreciar mejor las velocidades iniciales de liberación de tiol con paralizadores potenciales, se modificó el experimento del Ejemplo 17 para permitir la "captura" inmediata de cualquier tiol liberado, mediante reacción con DTNB. Debido a la necesidad de medir las reacciones de DTNB a pH 8, no fue posible usar el mismo pH como en el Ejemplo 17, pero se estudiaron las mismas tres aminas. DTNB (80 µg/ml) se preparó recientemente en 0,2M de fosfato de sodio, 1 mM de EDTA, pH 8,0, y se dispensó (200 µl por pocillo) en una placa de 96 pocillos clara. Se añadieron 20 µl de 100 mM de 2IT y se leyó la absorbancia a A_{405} cada 2 min. usando una función cíclica de placa automática. Los resultados se dan en la Figura 14.

Como se puede observar en la Figura 14, las tres aminas inducen la liberación de tioles a velocidades muy similares, aunque la glicina es la más rápida. Puesto que también parece que la glicina soporta una reacción intramolecular relativamente rápida que conduce a la desaparición de los tioles (Ejemplo 17), es la más prometedora de las tres aminas para detener las reacciones de conjugación. También es evidente una liberación significativa de tioles en las condiciones usadas normalmente para tiolación de biomoléculas (es decir, la reacción de control en este experimento).

Ejemplo 19

La liofilización se emplea habitualmente para estabilizar y prolongar la semivida de productos a base de proteínas. Los excipientes que se usan a menudo para ayudar a estabilizar los constituyentes activos incluyen crioprotectores, cuya función principal es proporcionar protección durante la etapa de congelación, y lioprotectores, cuya función es prevenir la degradación durante la liofilización y/o durante el almacenamiento. Para cualquier muestra nueva, la mejor formulación para la liofilización sólo se puede determinar empíricamente. No hay precedentes, que sepamos, para la liofilización de TG o para la liofilización de TG en presencia de moléculas B-Y. La liofilización de mezclas de TG y B-Y requiere el desarrollo de una única formulación para estabilizar funciones Y (por ejemplo maleimidadas), TG (por ejemplo 2-IT) y la actividad biológica de B (por ejemplo HRP, fosfatasa alcalina). Claramente, si hay daño significativo a un ingrediente activo, cualesquiera reacciones de conjugación subsiguientes se verán comprometidas, incluso si los otros componentes están bien conservados.

En experimentos iniciales con un abanico de tampones de composición y pH variables, se evaluó el grado de apertura indeseada del anillo de 2-IT (solo) durante la liofilización midiendo el contenido de tioles libres del material liofilizado usando el reactivo DTNB. Parece que la liberación de tioles libres depende del pH de la disolución antes de la liofilización. Las disoluciones ácidas, incluyendo ácido clorhídrico diluido (1,2 mM-12 mM), 20 mM de fosfato de sodio (pH < 6,5) y 20 mM de acetato de sodio (pH 5), dieron materiales liofilizados con un contenido de tioles libres bajo, consistente con la mayor estabilidad de la disolución señalada previamente de 2-IT a pH bajo (Ejemplo 8). Los tampones usados habitualmente para reacciones de conjugación (es decir, aquellos basados en disoluciones neutras o ligeramente básicas de fosfato, NaCl y EDTA) fueron estabilizantes relativamente malos de 2-IT en la liofilización, como lo fueron otros tampones de pH > 6,5.

Se realizó una observación inesperada cuando las muestras de 2-IT liofilizadas se dejaron incubar con el reactivo DTNB durante varias horas. Normalmente, debido a que 2-IT es inestable al pH usado para la reacción con DTNB (pH 8), hay una liberación de tioles dependiente del tiempo, y de este modo una señal de fondo creciente. A pesar de la estabilización aparente de 2-IT en acetato de sodio (es decir, ausencia de tioles tras la liofilización), el incremento esperado dependiente del tiempo en la señal de fondo estuvo muy ausente. Esta observación no se explicó por ningún efecto inhibitorio directo de acetato sobre la reacción de DTNB con los tioles. No se investigó adicionalmente la transformación química supuesta de TG1 que previno la liberación de grupos tiol, pero puede ser similar a la reacción secundaria observada en otras condiciones para TG1 (véase p4), que conduce a la formación de un tioéter no reactivo. Los conjugados preparados con mezclas de mal-HRP/TG1 que se liofilizaron en presencia de 4 mM de fosfato de sodio, pH 5,8, dieron señales muchísimo más fuertes en ELISA que aquellos liofilizados en presencia de 5 mM de acetato de sodio pH 5. Tomados juntos, los resultados ilustran que, aunque es necesario un pH bajo para la estabilización de TG1 durante la liofilización (y de este modo para la formación eficiente del conjugado llevada a cabo subsiguientemente a un pH ligeramente alcalino), un pH bajo solo no es suficiente para preservar la integridad de TG1.

En una realización preferida de la presente invención, el tampón para liofilizar mezclas de B-Y/TG1 comprende fosfato de sodio. El pH del tampón está preferiblemente por debajo de 6,5, y más preferiblemente por debajo de 6,0.

Puesto que es necesario elevar el pH de la mezcla liofilizada al reconstituirla con una disolución tamponada de A a fin de proporcionar condiciones óptimas para las reacciones de bioconjugación, se prefieren mezclas liofilizadas débilmente tamponadas. Preferiblemente, la concentración del tampón está por debajo de 200 mM, más preferiblemente por debajo de 50 mM, y lo más preferible por debajo de 20 mM.

En una realización preferida de la presente invención, la mezcla de TG liofilizado/B-Y/tampón de fosfato también contiene un poliol, tal como un azúcar o dextrano, o combinaciones de polioles. Lo más preferible, el poliol es trehalosa. La concentración de trehalosa es preferiblemente > 1%, y lo más preferible alrededor de 5% (p/v).

En una realización particularmente preferida, en la que B-Y es HRP o fosfatasa alcalina, la mezcla también contiene un ion metálico o iones metálicos. En una realización particularmente preferida, el ion metálico es Ca^{2+} o Mg^{2+} (típicamente añadido como MgCl_2), preferiblemente en el intervalo de 1-10 mM de Mg^{2+} , deseablemente alrededor de 5 mM.

5 **Ejemplo 19.1 Liofilización de enzimas activadas con maleimida con 2-IT**

- Fosfatasa alcalina (16,2 mg/ml; código ALP112G de Biozyme) en 5 mM de Tris/5 mM de MgCl_2 /0,1 mM de ZnCl_2 , pH 7,0, se diluyó hasta 5 mg/ml con 0,1M de fosfato de sodio pH 7,2, y se activó con 4 mM de sulfo-SMCC durante 1 h a 25°C. La muestra se desaló entonces en 10 mM de fosfato de sodio pH 5,8 para dar una concentración de 3,125 mg/ml. 2. Se añadieron excipientes, según se requiera, y se añadió finalmente 2-IT, típicamente a una concentración de 400 u 800 μM . La concentración final de enzima antes de la liofilización fue 2,5 mg/ml. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido en tubos de polipropileno o viales de vidrio antes de la liofilización en un liofilizador Advantage ES usando un ciclo de 24 horas: etapa 1, temperatura del almacén -40°C durante 1320 minutos, etapa 2 temperatura del almacén -10°C durante 60 minutos, y etapa 3 temperatura del almacén +20°C, 60 minutos. Tras la liofilización, las muestras se almacenaron a -20 ó 37°C durante varios días.
- 15 Se preparó HRP modificada con EDDBA como en el Ejemplo 11, y se activó con SMCC como se describe anteriormente. La muestra se desaló como se describe anteriormente en 10 mM de fosfato de sodio pH 5,8, y se preparó adicionalmente para la liofilización como se describe para fosfatasa alcalina.

Ejemplo 20 Estabilidad de mezclas de mal-HRP/2-IT liofilizadas

- HRP modificada con EDDBA y activada por maleimida se desaló en tampón de pH 5,8 (como se describe anteriormente, Ejemplo 19), y se añadió TG1 para dar una concentración final de 800 μM antes de la liofilización de porciones de 40 μl (100 μg de HRP). 320 μl de anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra 1 mg/ml en 20 mM de fosfato de sodio/150 mM de NaCl, pH 7,2, se suplementaron con 32 μl de 2M de Hepes/10 mM de EDTA, pH 7,25. 100 μl de este material se usaron para reconstituir cada vial de la mezcla liofilizada. La conjugación se dejó transcurrir a 25°C toda la noche, y los conjugados resultantes se ensayaron mediante ELISA en una placa revestida con IgG de ratón, preparada como se describe en el Ejemplo 3.

Los resultados se ilustran en la Figura 15, que es una gráfica de la absorbancia a 405 nm (en unidades arbitrarias) frente a una escala logarítmica de la dilución del conjugado. La gráfica muestra la titulación de conjugados preparados como se describe en este ejemplo usando mezclas liofilizadas que se incubaron toda la noche, antes de la conjugación, a -20°C (círculos negros), 25°C (círculos blancos) o 37°C (cuadrados negros).

- 30 Como se puede observar, puesto que la mezcla liofilizada se sometió a temperatura creciente, hay una pérdida notable de comportamiento de los conjugados resultantes. A una dilución de 1/10.000, la señal de la absorbancia para el conjugado preparado con mezcla almacenada toda la noche a 37°C es ~20% de aquella para el conjugado preparado con una mezcla almacenada a -20°C, y la dilución de conjugado necesaria para dar una absorbancia de 1,0 está desplazada en un orden de magnitud.

35 **Ejemplo 21. Estabilización de mal-enzima/2-IT liofilizado**

- Los azúcares ayudan a menudo a estabilizar proteínas durante la liofilización y/o almacenamiento, y la inclusión de trehalosa en mezclas liofilizadas de maleimida-EDDBA-HRP/TG y maleimida-fosfatasa alcalina/TG a 37°C incrementó significativamente la estabilidad en comparación con muestras que carecen del azúcar (según se mide mediante el comportamiento en ELISA de conjugados preparados a partir de las mezclas) (véase la Tabla más abajo y el Ejemplo 20). Puesto que la fosfatasa alcalina se ensaya habitualmente en presencia de iones Mg^{2+} y Zn^{2+} , se consideró la posibilidad de que los iones metálicos pueden ayudar adicionalmente a estabilizar esta enzima durante la liofilización o el almacenamiento. Sin embargo, puesto que los iones metálicos pueden tener efectos dañinos sobre otros componentes (por ejemplo 2-IT) durante la liofilización, o pueden interferir con reacciones de conjugación subsiguientes, se realizaron algunos ensayos iniciales usando HRP, que es más barata que fosfatasa alcalina. Las mezclas liofilizadas se prepararon como se describe en el Ejemplo 19, que contienen HRP modificada con EDDBA y activada por maleimida en 10 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 5,8, más trehalosa 5% (p/v), iones metálicos (como se señala más abajo), y 2-IT (400 μM). Las mezclas se almacenaron a 37°C antes de la conjugación. Para nuestra sorpresa, para muestras de HRP que se salpicaron con 5 mM de MgCl_2 (que no se requiere para la actividad de HRP) y que después se liofilizaron, la estabilidad a 37°C de la mezcla liofilizada mejoró notablemente, según se juzga por el comportamiento en ELISA de conjugados de anti-IgG de conejo de cabra-HRP preparados con la mezcla, y ensayados como se describe en el Ejemplo 3. En estudios subsiguientes con mezclas de trehalosa/2-IT/maleimida-fosfatasa alcalina, se encontró que MgCl_2 tuvo no sólo una acción protectora sobre la fosfatasa alcalina durante el almacenamiento a temperatura elevada, sino también una acción crioprotectora. Estos resultados y aquellos para otros iones metálicos se resumen en la tabla a continuación.

- 55 Estabilización de mezclas de mal-EDDBA-HRP/2-IT y mal-alcalina fosfatasa/2-IT a 37°C según se mide mediante el comportamiento del conjugado en ELISA

ES 2 483 970 T3

Enzima	Aditivo	% de Trehalosa (-20°C)
Mal-EDBA-HRP	Trehalosa	25
Mal-EDBA-HRP	Trehalosa/Mg ²⁺ (5 mM)	77
Mal-EDBA-HRP	Trehalosa/Zn ²⁺ (0,5 mM)	34
Mal-EDBA-HRP	Trehalosa/Ca ²⁺ (5 mM)	84
Mal-fosfatasa alcalina	Trehalosa	37
Mal-fosfatasa alcalina	Trehalosa/Mg ²⁺ (5 mM)	104
Mal-fosfatasa alcalina	Trehalosa/Zn ²⁺ (0,5 mM)	44
Mal-fosfatasa alcalina	Trehalosa/Mg ²⁺ (5 mM)/Zn ²⁺ (0,5 mM)	102
Mal-fosfatasa alcalina	Trehalosa/Mg ²⁺ (5 mM)	148*
*Mg ²⁺ /trehalosa a -20°C frente a trehalosa a -20°C		

5 Se incubaron mezclas liofilizadas a 37°C durante 6 días (HRP) o 5 días (fosfatasa alcalina), y después se usaron para preparar conjugados de anti-conejo de cabra, que se ensayaron en un ELISA para IgG de conejo. El % de los valores de la actividad se determinó dividiendo el valor de la absorbancia de ELISA para una dilución 1/10.000 de conjugado preparado a partir de material almacenado a 37°C entre el valor de la absorbancia obtenido para una formulación de trehalosa (es decir, sin iones metálicos) preparada a partir de material almacenado a -20°C, excepto que se señale de otro modo.

10 Como se puede observar, la trehalosa mejora la estabilidad de la mezcla a temperatura elevada (la pérdida del 75% de actividad durante 6 días [1ª línea de la tabla] es ampliamente similar a aquella a lo largo de 1 día sin trehalosa; véase el Ejemplo 20). Mg²⁺ mejora además significativamente la estabilidad de mezclas de mal-EDBA-HRP/2-IT/trehalosa, y sólo hay una pérdida del 23% de actividad tras la incubación durante 6 días a 37°C de la mezcla liofilizada que se usó para preparar conjugado. Con respecto a un kit de conjugación que comprende materiales liofilizados, la formulación con trehalosa y Mg²⁺ facilita enormemente el transporte a temperaturas ambiente. El calcio (5 mM) también estabilizó mezclas de mal-EDBA-HRP/2-IT/trehalosa, pero el Zn²⁺ a concentraciones empleadas normalmente en ensayos de fosfatasa alcalina (0,5 mM) tuvo muy poco efecto protector.

15 Aparece un patrón similar con fosfatasa alcalina, con una mejora notable en la reactividad de ELISA de los conjugados resultantes si la mezcla de mal-fosfatasa alcalina/2-IT se liofiliza en presencia de trehalosa y Mg²⁺. En comparación con formulaciones que contienen trehalosa sola y almacenadas a -20°C, no hay aparentemente pérdida de actividad después de 5 días de almacenamiento a 37°C. A diferencia de HRP, sin embargo, en la que el efecto beneficioso de los excipientes se observa a temperatura elevada, en lugar de durante la liofilización, las mezclas de mal-fosfatasa alcalina/2-IT también están protegidas por los excipientes durante la congelación/liofilización. De este modo, las muestras liofilizadas en presencia de Mg²⁺ son sustancialmente más activas inmediatamente después de la liofilización que aquellas en ausencia del ion metálico.

REIVINDICACIONES

1. Un método para hacer reaccionar una primera entidad química, que es un anticuerpo, y una segunda entidad química enzimática o ficobiliproteína fluorescente, para formar un conjugado en el que las entidades químicas primera y segunda están unidas covalentemente una con respecto a la otra, en el que la segunda entidad química comprende una pluralidad de grupos amina que se hacen reaccionar con un exceso de un reactivo heterobifuncional para generar una pluralidad de grupos reactivos con sulfhidrilo, comprendiendo el método poner en contacto simultáneo la primera entidad química, la segunda entidad química y un generador de tiol, en el que el generador de tiol reacciona con la primera entidad química en una reacción de tiolación que da como resultado la formación de un grupo sulfhidrilo libre en la primera entidad química, y el grupo sulfhidrilo libre reacciona con la segunda entidad química para formar el conjugado, y en el que la segunda entidad química es polivalente con respecto a su reactividad con los grupos sulfhidrilo, y en el que no hay separación o separación parcial de la primera entidad química tiolada del generador de tiol en exceso o de cualesquiera subproductos que se puedan formar antes de la puesta en contacto con la segunda entidad química.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el generador de tiol comprende 2-iminotiolano.
3. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la relación de segunda entidad química a generador de tiol está en el intervalo 1:1 a 1:20.
4. Un método según la reivindicación 3, en el que la relación está en el intervalo 1:10 a 1:15.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera entidad química, a segunda entidad química y el generador de tiol se combinan simultáneamente en un procedimiento de una etapa.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una primera etapa en la que se combinan el generador de tiol y la primera entidad química, y una segunda etapa en la que se combina la segunda entidad química con el generador de tiol y la primera entidad química.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una primera etapa en la que se combinan las entidades químicas primera y segunda, y una segunda etapa en la que se combina el generador de tiol con las entidades químicas primera y segunda.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una primera etapa en la que se combinan el generador de tiol y la segunda entidad química, y una segunda etapa en la que se combina la primera entidad química con el generador de tiol y la segunda entidad química.
9. Un método según la reivindicación 8, en el que la primera entidad química se añade en forma líquida a una mezcla seca que comprende la segunda entidad química y el generador de tiol.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además añadir un nucleófilo para terminar la reacción de conjugación.
11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda entidad química comprende una enzima.
12. Un kit de conjugación para uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una muestra liofilizada de la segunda entidad química y una muestra del generador de tiol según la reivindicación 1, e instrucciones para llevar a cabo el método de la reivindicación 1.
13. Un kit según la reivindicación 12, en el que al menos una muestra de generador de tiol se selecciona de una tiolactona, una iminotiolactona, un episulfuro y una tiazolidina.
14. Un kit según la reivindicación 12 ó 13, que comprende adicionalmente un poliol.
15. Un kit según la reivindicación 12, en el que el generador de tiol es 2-iminotiolano a un pH por debajo de 7,8.

ELISA de conjugado Ab1-HRP

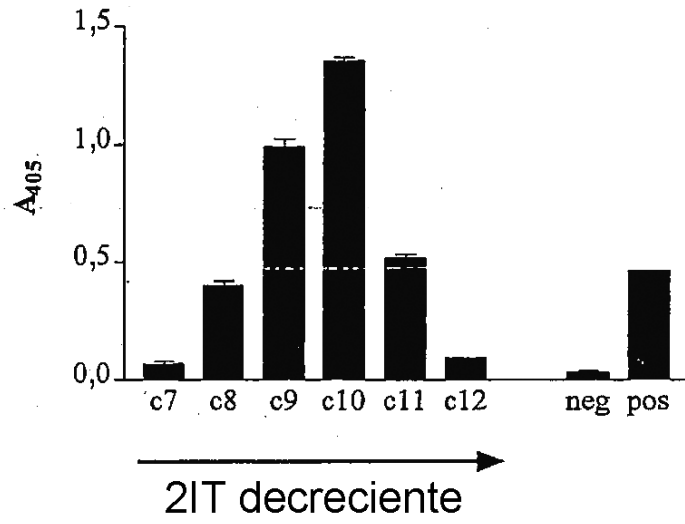


fig 1 (Ejemplo 4)

Efecto de la variación del pH sobre la eficiencia de la conjugación

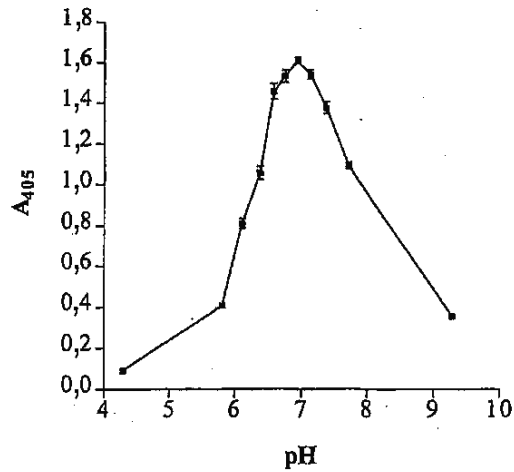


fig 2 (Ejemplo 5)

Óptimo de pH para conjugación Ab1-Gox

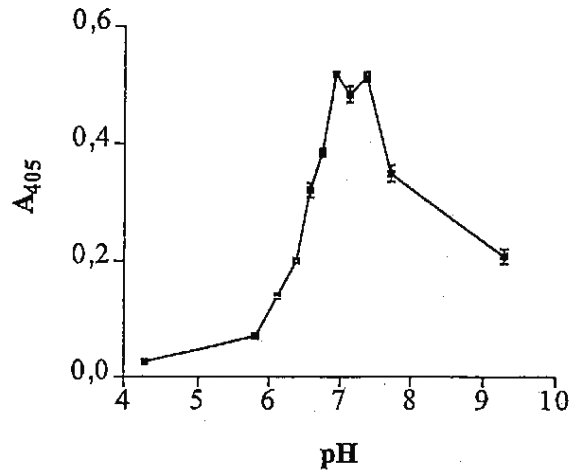


fig 3 (Ejemplo 6)

Efecto del tipo de tampón sobre la eficiencia de la conjugación

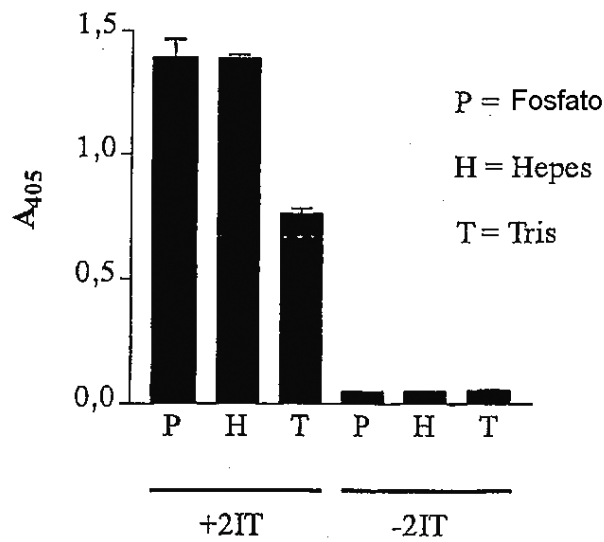


fig 4 (Ejemplo 7)

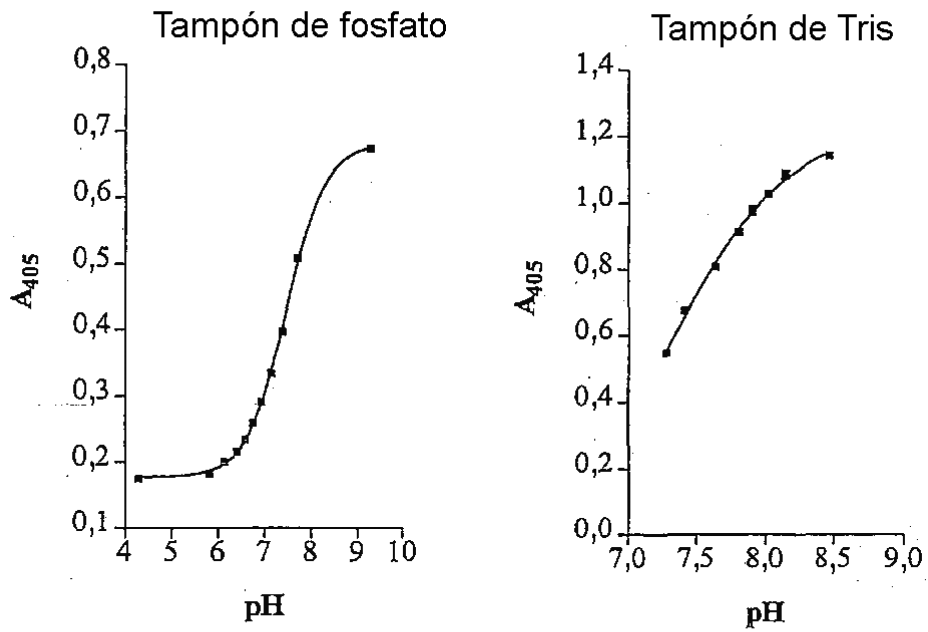


fig 5 (Ejemplo 8)

Transcurso de tiempo de la formación de la conjugación

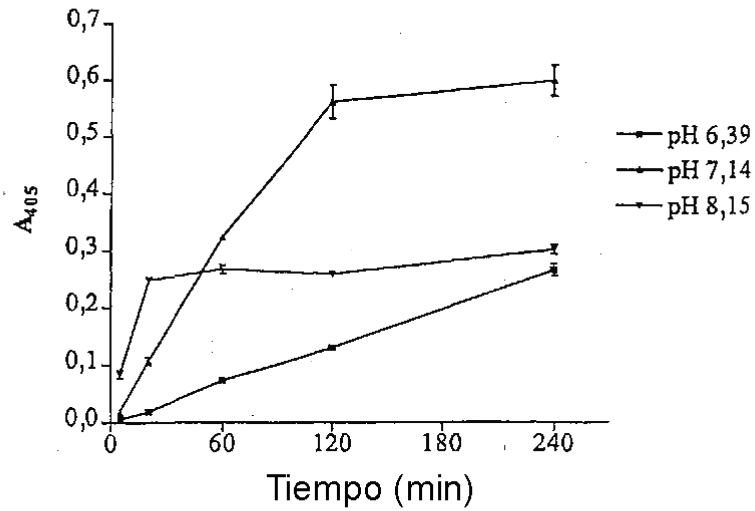


fig 6 (Ejemplo 9)

Efecto de la variación del orden de adición

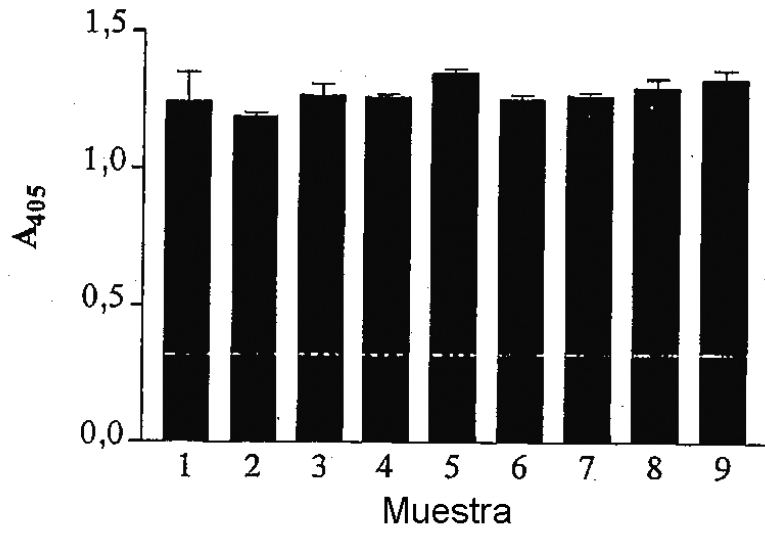


fig 7 (Ejemplo 10)

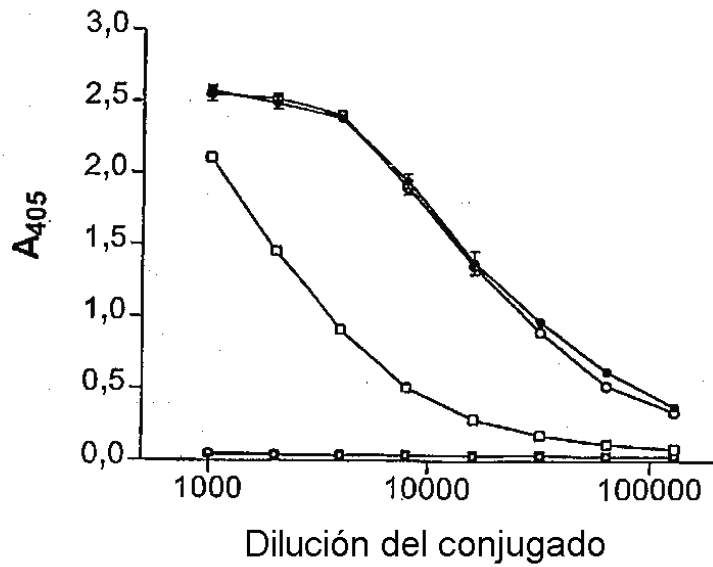


fig 8 (Ejemplo 12)

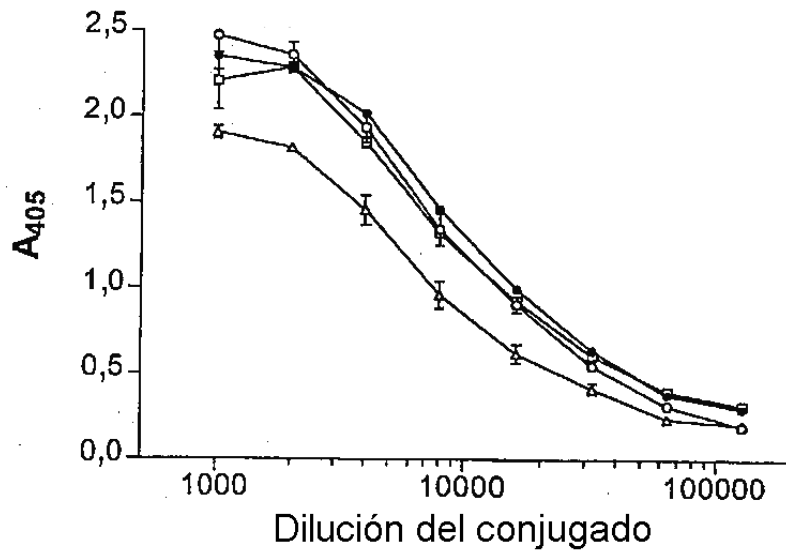


fig 9 (Ejemplo 13)

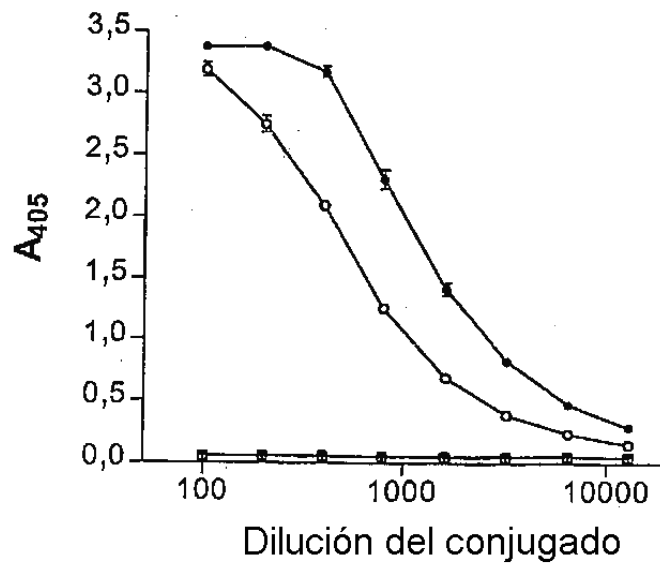


fig 10 (Ejemplo 14)

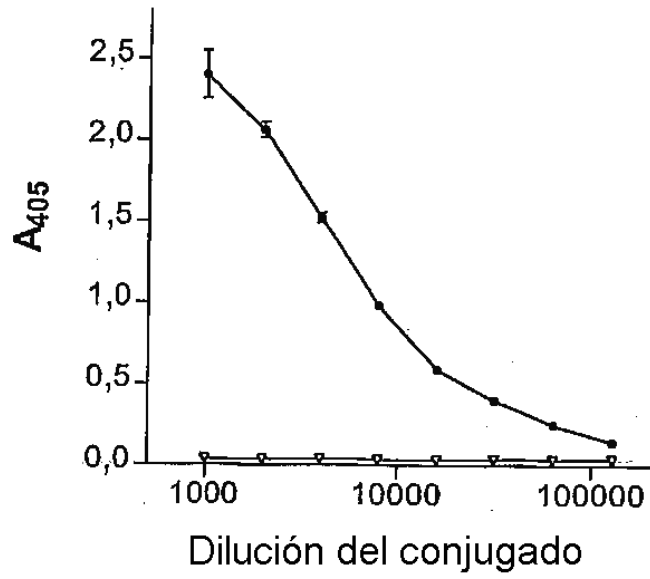


fig 11 (Ejemplo 15)

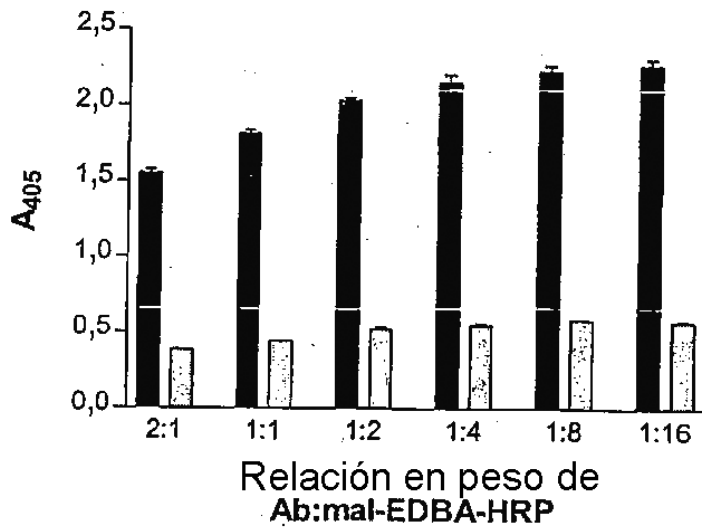


fig 12 (Ejemplo 16)

Liberación de tiol a partir de 2IT por diversas aminas

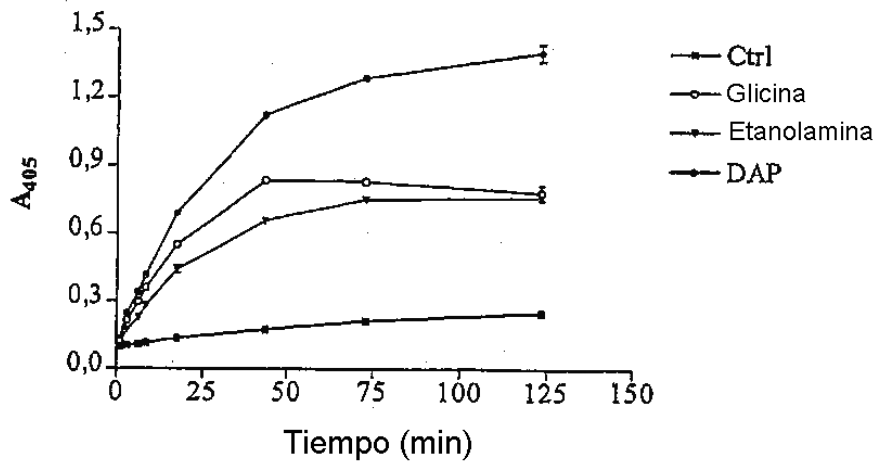


fig 13 (Ejemplo 17)

Captura de tiol usando DTNB

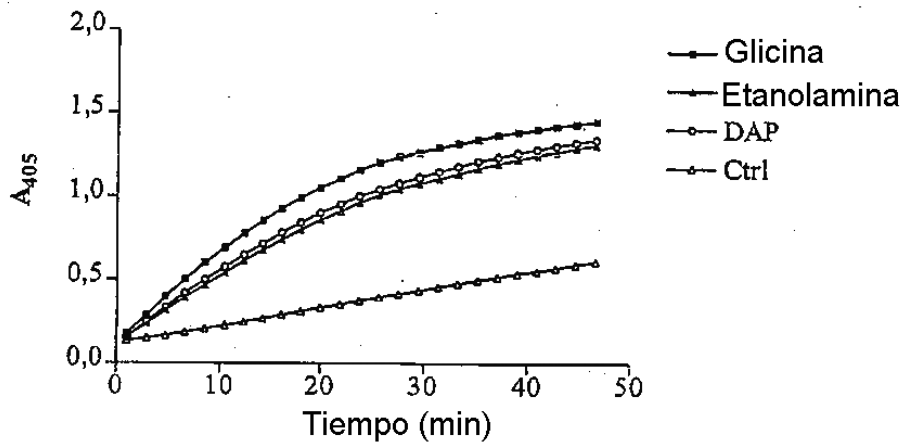


fig 14 (Ejemplo 18)

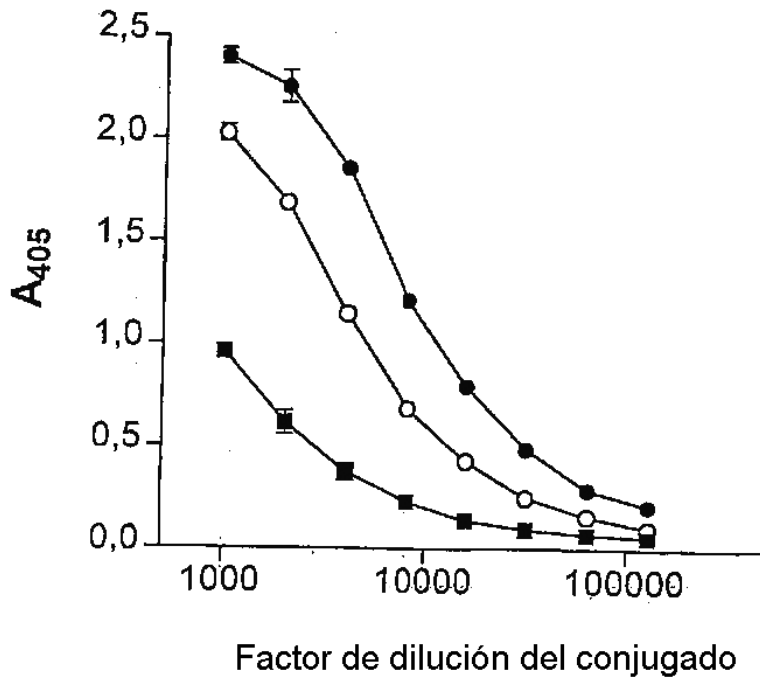


fig 15