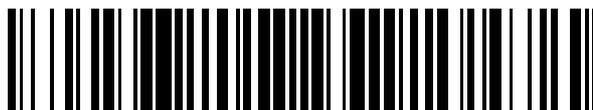


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 518**

51 Int. Cl.:

C07C 319/02 (2006.01)

C07C 327/28 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C07C 323/60 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C07K 1/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2006 E 06838327 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1951316**

54 Título: **Conjugado molecular**

30 Prioridad:

23.11.2005 US 739794 P

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

19.10.2015

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. INNOVATION PARK DRIVE
TUCSON, ARIZONA 85755, US**

72 Inventor/es:

**BIENIARZ, CHRISTOPHER;
ASHWORTH-SHARPE, JULIA;
KERNAG, CASEY A.;
KOSMEDER, JEROME W. y
LEFEVER, MARK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 548 518 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

Conjugado molecular

5 Campo

La presente invención se refiere a conjugados moleculares, a conectores para preparar dichos conjugados, a métodos para preparar los conjugados y los conectores, y a métodos de utilización de los conjugados. Más particularmente, la presente invención se refiere a conjugados de anticuerpos específicos de Fc, a conectores de hidrazida tiol para preparar conjugados específicos de Fc y a métodos para preparar conjugados específicos de Fc.

Antecedentes

15 Se ha desarrollado una amplia diversidad de métodos para unir moléculas entre sí para formar conjugados. Resultan de particular interés los conjugados biomoleculares que se preparan típicamente para combinar las funcionalidades de las moléculas unidas en un solo constructo. Un tipo de conjugado biomolecular combina una molécula biológica que se une específicamente a otra molécula (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, una lectina o una avidina) y un marcaje detectable (tal como un marcaje fluorescente, nanopartícula fluorescente o un enzima).

20 Pueden utilizarse conjugados de anticuerpos y marcajes detectables (conjugados de anticuerpos) en inmunoensayos para la detección de moléculas diana específicas en muestras biológicas. La parte anticuerpo de dichos conjugados se une específicamente a una diana en la muestra y el marcaje detectable se utiliza para proporcionar una señal detectable que indica la presencia y/o localización de la diana. Un tipo de conjugado que se ha vuelto ampliamente utilizado, especialmente para el análisis inmunohistoquímico, es un conjugado de un anticuerpo y un enzima (conjugado de anticuerpo-enzima). Se genera una señal detectable mediante la adición de un sustrato a la muestra bajo condiciones en las que la parte enzima del conjugado de anticuerpo-enzima convierte el sustrato en un producto detectable (tal como un producto coloreado, de color diferente o fluorescente) en el sitio en el que la parte anticuerpo se une a su diana.

30 Los conjugados de anticuerpos típicamente se preparan utilizando reactivos de acoplamiento que se caracterizan porque presentan por lo menos dos grupos reactivos, uno de los cuales se hace reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo mientras que el otro se hace reaccionar con un grupo funcional en el marcaje detectable. Sin embargo, el acoplamiento puede conducir a la inactivación del anticuerpo o el marcaje detectable o de ambos. En particular, el acoplamiento puede desactivar los conjugados de anticuerpo-enzima mediante efectos estéricos o debido a que los reactivos de acoplamiento reaccionan con grupos funcionales situados en partes del anticuerpo y/o enzima que resultan críticos para su especificidad y/o actividad catalítica. Además, algunos esquemas de acoplamiento conducen a que los conjugados presentan una solubilidad en agua reducida.

40 Los esquemas de acoplamiento que pueden proporcionar conjugados de anticuerpo-enzima con menores alteraciones de la especificidad del anticuerpo y/o de la actividad enzimática resultan deseables y permiten alcanzar una sensibilidad más alta de los ensayos inmunoquímicos, tales como los ensayos inmunohistoquímicos. Una mayor sensibilidad es de particular importancia para los procedimientos automatizados, en los que etapas de amplificación adicionales no resultan deseables.

45 Resumen

Se da a conocer un conjugado molecular que incluye un conector hidrazida tiol. En una realización se proporciona el conjugado de anticuerpo y marcaje detectable, incluyendo un conector hidrazida tiol unido covalentemente a la parte Fc del anticuerpo. El conjugado específico para Fc de la presente realización proporciona una sensibilidad de detección mejorada, permitiendo de esta manera que la detección inmunohistoquímica de una molécula diana permita más fácilmente la automatización y las aplicaciones de alto rendimiento.

55 Se da a conocer además un método para preparar un conjugado que utiliza un conector hidrazida tiol. En una realización, no se requiere un grupo protector para un grupo tiol del conector debido a que el conector se hace reaccionar con una primera molécula bajo condiciones en las que el grupo tiol se encuentra sustancialmente presente en su forma ácida neutra y, de esta manera, es sustancialmente no reactivo. Bajo dichas condiciones, puede formarse un enlace covalente entre un grupo hidrazida del compuesto conector y una primera molécula, conservando simultáneamente de manera sustancial el grupo tiol para una reacción posterior con un grupo reactivo con el tiol de una segunda molécula.

60 Se dan a conocer además conectores hidrazida tiol y métodos para preparar conectores hidrazida tiol. Además, se describen métodos para utilizar un conjugado dado a conocer para detectar una molécula diana en una muestra, tal como una sección de tejido o una muestra de citología. Los métodos para detectar una molécula diana pueden

automatizarse fácilmente debido a la sensibilidad mejorada que muestran los conjugados dados a conocer. En determinadas realizaciones, se proporcionan ensayos multiplexados que utilizan los conjugados dados a conocer, por ejemplo ensayos multiplexados que utilizan conjugados de anticuerpo dados a conocer que presentan moléculas fluorescentes o nanopartículas fluorescentes a modo de marcaje detectable.

5 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de Kappa en tejido de amígdala que utiliza un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

10 La FIG. 2 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de Lambda en tejido de amígdala que utiliza un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

15 La FIG. 3 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección del CMV en tejido de pulmón que utiliza un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

La FIG. 4 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de EBER en tejido de bazo que utiliza un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

20 La FIG. 5 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección del VPH en tejido de xenoinjerto CaSki que utiliza un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

La FIG. 6 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección del VPH en tejido de xenoinjerto HeLa que utiliza un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

25 La FIG. 7 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección del VPH en tejido de xenoinjerto SiHa que utiliza un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

La FIG. 8 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección del VPH en muestras de citología que utilizan un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

30 La FIG. 9 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de actina en tejido muscular que utiliza un conjugado dado a conocer de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina y que utiliza un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

35 La FIG. 10 es una serie de imágenes que muestra una comparación de la sensibilidad de los diferentes conjugados de anticuerpo-enzima dados a conocer entre sí y respecto a conjugados de anticuerpo-enzima corporal preparados mediante otros métodos.

40 Descripción detallada de varias realizaciones ilustrativas

Se ilustran aspectos adicionales de la invención mediante las descripciones y ejemplos, posteriormente, después de las abreviaturas y términos a continuación.

45 *I. Abreviaturas*

Antic. -anticuerpo
 (Antic. - FA) -conjugado de anticuerpo-fosfatasa alcalina
 FA -fosfatasa alcalina
 BSA -albúmina de suero bovino
 50 CMV -citomegalovirus
 EBER -ARN temprano del virus de Epstein-Barr
 DL -marcaje detectable
 Fc -fragmento cristalizante
 HRP -peroxidasa de rábano picante
 55 IHQ -immunohistoquímica
 ISH -hibridación *in situ*
 MAL -maleimida
 MBCH -carbohidrazida de ácido mercaptobutírico
 MBH -hidrazida de ácido mercaptobutírico
 60 NHS -N-hidroxi-succinimida
 PEG -polietilenglicol
 SBM -molécula de unión específica

II. Términos

Los términos "un", "una", "el" o "la" incluyen los referentes tanto singulares como plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 5 El término "animación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la reacción de un grupo carbonilo de un aldehído o de una cetona con un grupo amina, en el que un compuesto que contiene amina, tal como una amina o una hidrazida, reacciona con el aldehído o cetona para formar en primer lugar una base de Schiff que seguidamente puede reorganizarse reversiblemente para generar una forma más estable, u opcionalmente resultar reducida para impedir la reversión de la reacción. Entre las condiciones de "aminación reductora" se incluyen la adición de un agente reductor, más típicamente la adición de un agente reductor suave, tal como cianoborohidruro sódico o uno de sus congéneres, por ejemplo triacetoxiborohidruro sódico. Entre otros agentes reductores suaves que pueden utilizarse se incluyen diversas boranos de amina.
- 10
- 15 El término "anticuerpo" se refiere colectivamente a una inmunoglobulina o molécula de tipo inmunoglobulina (incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunológica en cualquier organismo, por ejemplo en mamíferos, tales como mamíferos, cabras, conejos y ratones), o un fragmento de las mismas que se une específicamente a una diana (o a un grupo de dianas altamente similares) excluyendo sustancialmente la unión a otras moléculas. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une específicamente a una diana con una constante de unión que es por lo menos 10^3 M^{-1} superior, 10^4 M^{-1} superior o 10^5 M^{-1} superior a una constante de unión para otras moléculas en una muestra. En otras realizaciones, un anticuerpo presenta un valor de K_d para la unión a un determinante antigénico (tal como un hapteno o epítopo) que es del orden de 10^{-6} M o inferior, tal como 10^{-9} M o inferior, o incluso 10^{-12} M o inferior. Los valores de K_d pueden determinarse, por ejemplo, mediante ELISA competitiva (ensayo de inmunosorción ligada a enzima) o utilizando un dispositivo de resonancia del plasmón superficial, tal como Biacore T100, que se encuentra disponible de Biacore, Inc., Piscataway, NJ. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen fragmentos de anticuerpo proteolíticos, tales como los fragmentos $F(ab)_2$, los fragmentos Fab', los fragmentos Fab'-SH y los fragmentos Fab tal como se conocen de la técnica, fragmentos de anticuerpo recombinante (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, diacuerpos y triacuerpos, tal como se conocen de la técnica) y anticuerpos de camélidos (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.015.695, nº 6.005.079, nº 5.874.541, nº 5.840.526, nº 5.800.988 y nº 5.759.808). Entre los anticuerpos se incluyen preparaciones de anticuerpos monoclonales y policlonales. Aunque un anticuerpo de un conjugado dado a conocer puede unirse específicamente a cualquier molécula particular o a cualquier grupo particular de moléculas altamente similares, en realizaciones particulares, el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-hapteno (que puede utilizarse, por ejemplo, para detectar una secuencia de sonda marcada con hapteno con diana en una secuencia de ácidos nucleicos de interés). En realizaciones particulares, el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-anticuerpo que puede utilizarse como anticuerpo secundario en un inmunoensayo. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender un anticuerpo anti-IgG, tal como un anticuerpo anti-IgG de ratón, un anticuerpo anti-IgG de conejo o un anticuerpo anti-IgG de cabra.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 La expresión "condiciones en las que un grupo tiol de un conector hidrazida tiol se encuentra sustancialmente presente en su forma ácida neutra" se refiere a condiciones, tales como las condiciones de pH, en las que menos de aproximadamente 1% del grupo tiol (-SH, la forma de ácido neutro protonada) del conector se encuentra presente en su forma de base conjugada (-S⁻; no protonada, forma con carga negativa). Por ejemplo, bajo dichas condiciones menos de aproximadamente 1%, menos de aproximadamente 0,01%, o incluso menos de aproximadamente 0,001% del conector puede encontrarse en la forma de base conjugada. Entre las condiciones bajo las que el grupo tiol del compuesto conector hidrazida tiol se encuentra sustancialmente presente en su forma de ácido neutro se incluyen un pH inferior a aproximadamente 7, por ejemplo un pH inferior a aproximadamente 6, tal como un pH inferior a aproximadamente 5,5. En realizaciones particulares, entre dichas condiciones se incluye un abanico de valores de pH, por ejemplo un pH de entre aproximadamente 3 y un pH de aproximadamente 7, un pH de entre aproximadamente 4 y un pH de aproximadamente 7, un pH de entre aproximadamente 4 y un pH de aproximadamente 6, un pH de entre aproximadamente 4,5 y un pH de aproximadamente 5,5. o cualquier subintervalo de cada uno de dichos intervalos. En otras realizaciones, el límite superior del intervalo de pH en el que un grupo tiol de un conector particular se encuentra sustancialmente presente en su forma de ácido neutro (encontrándose presente menos de 1% del grupo tiol en forma de la forma de base conjugada) puede ser superior a 7, tal como un pH de 8. El experto ordinario en la materia podrá determinar fácilmente un límite superior del intervalo de pH en el que un grupo tiol dado se encontrará sustancialmente presente en la forma de ácido neutro utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach y un valor de pKa para un grupo tiol del conector. En todavía otras realizaciones, un grupo tiol de un conector particular puede encontrarse sustancialmente presente en su forma de ácido neutro en un sistema de solventes para el que no puede determinarse un pH exacto, y el experto ordinario en la materia reconocerá que los sistemas de solventes que son menos polares que el agua pueden ayudar a mantener el grupo tiol en su forma de ácido neutro a pH aparentes más altos. Alternativamente, puede llevarse a cabo una determinación experimental de si bajo condiciones particulares un grupo tiol de un conector se encuentra sustancialmente presente en su forma de ácido neutro mediante la determinación de si el tiol reducirá un enlace
- 45
- 50
- 55
- 60

disulfuro presente en otra molécula. Por ejemplo, puede llevarse a cabo una determinación del número de grupos tiol libres (por ejemplo utilizando reactivo de Ellman) introducidos en una molécula que presenta disulfuros (tal como una inmunoglobulina) mediante contacto con el conector bajo condiciones particulares de pH (o pH estimado para sistemas no acuosos). La adición de un exceso del conector hidrazida tiol (tal como un exceso de 50 veces o más) durante un periodo de tiempo (tal como una hora o más) puede seguirse mediante la determinación del número medio de tioles libres introducidos en la molécula. En el caso de que se generen tioles libres en un grado sustancial (por ejemplo que se introduzcan por cada molécula de inmunoglobulina un número superior a una media de dos tioles), se demuestra que el tiol del conector no se encuentra sustancialmente presente en su forma de ácido neutro bajo las condiciones sometidas a ensayo. Por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7, un exceso de cien veces del conector MBH respecto a una inmunoglobulina se producirá una media de aproximadamente 2 tioles por cada molécula de inmunoglobulina. A un pH inferior, de 5, un exceso de mil veces del conector MBH producirá, de media, sustancialmente menos de 1 tiol por cada inmunoglobulina en 24 horas. Estos resultados demuestran que para el conector MBH, el grupo tiol se encuentra sustancialmente presente en su forma de ácido neutro a un pH de aproximadamente 7 o menos, ya que al bajar el pH, el equilibrio entre la forma de ácido neutro y su base conjugada se desplaza más hacia la forma de ácido neutro.

Un "conjugado" se refiere a dos o más moléculas (y/o materiales, tales como nanopartículas) que se encuentran covalentemente unidas a un constructo más grande. Los conjugados de la invención se definen en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, un conjugado incluye una o más moléculas biológicas (tales como péptidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, azúcares, polisacáridos, lípidos, glucoproteínas y lipoproteínas) unidas covalentemente a otra u otras moléculas, tales como otra u otras moléculas biológicas. En otras realizaciones, un conjugado incluye una o más moléculas de unión específica (tales como anticuerpos y secuencias de ácidos nucleicos) unidas covalentemente a uno o más marcajes detectables (tales como moléculas fluorescentes, nanopartículas fluorescentes, haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos).

Un "marcaje detectable" es una molécula o material que puede producir una señal detectable (tal como visual, electrónica o de otro tipo) que indica la presencia y/o la concentración del marcaje en una muestra. En caso de encontrarse conjugado con una molécula de unión específica, el marcaje detectable puede utilizarse para localizar y/o cuantificar la diana de la molécula de unión específica. De esta manera, la presencia y/o la concentración de la diana en una muestra puede detectarse mediante la detección de la señal producida por el marcaje detectable. Un marcaje detectable puede detectarse directa o indirectamente y pueden utilizarse varios marcajes detectables diferentes conjugados con diferentes moléculas de unión específica en combinación para detectar una o más dianas. Por ejemplo, un primer marcaje detectable, tal como un hapteno conjugado con una sonda de ácidos nucleicos o anticuerpo específico para una diana puede detectarse indirectamente mediante la utilización de un segundo marcaje detectable que se conjuga con una molécula que se une específicamente al primer marcaje detectable. Pueden conjugarse múltiples marcajes detectables que pueden detectarse separadamente, con diferentes moléculas de unión específica que se unen específicamente a diferentes dianas, proporcionando un ensayo multiplexado que puede proporcionar la detección simultánea de las múltiples dianas en una muestra. Puede generarse una señal detectable mediante cualquier mecanismo conocido o por descubrir, incluyendo la absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (incluyendo las radiofrecuencias, la frecuencia de microondas, la frecuencia de infrarrojos, la frecuencia visible y los fotones de frecuencia ultravioleta). Entre los marcajes detectables se incluyen moléculas y materiales coloreados, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia, proporcionando una diferencia detectable (tal como mediante la conversión de una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o mediante la producción de un precipitado o incrementando la turbidez de la muestra), haptenos que pueden detectarse mediante interacciones de unión anticuerpo-hapteno utilizando conjugados de anticuerpos detectablemente marcados adicionales y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Entre los ejemplos particulares de marcajes detectables se incluyen enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la fosfatasa ácida, la glucosa oxidasa, la β -galactosidasa, la β -glucuronidasa o la β -lactamasa; moléculas fluorescentes tales como las fluoresceínas, las coumarinas, los pigmentos BODIPY, las resorufinas y las rodaminas (pueden encontrarse muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes en The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR); nanopartículas, tales como puntos cuánticos (obtenidos, por ejemplo, de QuantumDot Corp., Invitrogen Nanocrystal Technologies, Hayward, CA; ver también las patentes US nº 6.815.064, nº 6.682.596 y nº 6.649.138); quelatos metálicos tales como los quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radioactivos o paramagnéticos como Gd^{3+} , y liposomas, por ejemplo liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas. En el caso de que el marcaje detectable incluya un enzima, puede utilizarse un sustrato detectable, tal como un cromógeno, un compuesto fluorogénico o un compuesto luminogénico en combinación con el enzima, generando una señal detectable (se encuentran disponibles comercialmente una amplia diversidad de dichos compuestos, por ejemplo de Invitrogen Corporation, Eugene, OR). Entre los ejemplos particulares de compuestos cromogénicos se incluyen diaminobenzidina (DAB), 4-nitrofenilfosfato (pNPP), rojo rápido, fosfato de bromocloroín-indolilo (BCIP), azul nitro-tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, rojo rápido, naranja AP, azul AP, tetrametilbencidina (TMB), sulfonato de 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina] (A-BTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido

(X-Gal), metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido (X-Gluc), 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul tetrazolio y violeta tetrazolio. Alternativamente, puede utilizarse un enzima en un esquema de detección metalográfica. Entre los métodos de detección metalográfica se incluyen utilizar un enzima tal como fosfatasa alcalina en combinación con un ión metálico soluble en agua y un sustrato redox-inactivo del enzima. El sustrato es convertido en un agente redox-activo por el enzima y el agente redox-activo reduce el ión metálico, provocando que forme un precipitado detectable (ver, por ejemplo, la solicitud de patente US copendiente n° 11/015.646, presentada el 20 de diciembre de 2004; solicitud de patente PCT n° 2005/003777 y la solicitud publicada de patente US n° 2004/0265922). Entre los métodos de detección metalográfica se incluyen utilizando un enzima oxidorreductasa (tal como la peroxidasa de rábano picante) conjuntamente con un ión metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, nuevamente para formar un precipitado detectable (ver, por ejemplo, la patente US n° 6.670.113). Los haptenos son moléculas pequeñas se unen específicamente a anticuerpos, aunque por sí mismos no inducirán una respuesta inmunológica en un animal y deben en primer lugar unirse a una molécula portadora de mayor tamaño, tal como una proteína o un ácido polinucleico para generar una respuesta inmunológica. Entre los ejemplos de haptenos se incluyen dinitrofenol, biotina, digoxigenina y fluoresceína. Se dan a conocer ejemplos adicionales de oxazol, pirazol, tiazol, nitroarilo, benzofurano, triterpeno, urea, tiourea, rotenoide, coumarina y haptenos ciclolignano en la solicitud copendiente de patente provisional US n° 60/856133, presentada el 1 de noviembre de 2006.

La expresión "conjugado específico de Fc" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un conjugado de una inmunoglobulina (o fragmento de la misma) en la que una segunda molécula (tal como un marcaje detectable) se une covalentemente a la parte glucosilada de la inmunoglobulina (o a un fragmento de una inmunoglobulina que conserva la parte glucosilada). La parte glucosilada de una inmunoglobulina se encuentra en la región Fc, que es una región de una inmunoglobulina que se encuentra situada en las cadenas pesadas de la inmunoglobulina en posiciones exteriores a la parte de la inmunoglobulina que es responsable para la actividad de unión específica de la inmunoglobulina.

La expresión "grupo hidrazida" se refiere a un grupo hidrazida (-CO-NH-NH₂), un grupo carbohidrazida (-NH-NH-CO-NH-NH₂), un grupo semicarbazida (-NH-CO-NH-NH₂), un grupo tiosemicarbazida (-NH-CS-NH-NH₂), un grupo tiocarbazida (-NH-NH-CS-NH-NH₂), un grupo dihidrazina de ácido carbónico (-NH-CO-NH-NH-CO-NH-NH₂) o un derivado que contiene azufre del mismo, o un grupo carboxilato de hidrazina (-O-CO-NH-NH₂) o un derivado que contiene azufre de los mismos.

La expresión "grupo reactivo con hidrazida" se refiere a un grupo de átomos que pueden reaccionar con y formar un enlace covalente con un grupo hidrazida. Los grupos aldehído y cetona son ejemplos de grupos reactivos con hidrazida. Los grupos reactivos con hidrazida pueden ser una parte intrínseca de una molécula o pueden introducirse en una molécula. Un método para introducir un grupo aldehído (un grupo reactivo con hidrazida) en polisacáridos y glucoproteínas (incluyendo anticuerpos) es mediante oxidación, tal como la oxidación mediada por peryodato de dioles vecinales. Además, los dobles enlaces en ácidos grasos insaturados y ceramidas pueden convertirse en dioles con tetraóxido de osmio y después ser oxidados por peryodato a aldehídos. Además, los residuos N-terminales de serina y treonina de péptidos y proteínas pueden oxidarse selectivamente con peryodato en grupos aldehído, permitiendo la modificación selectiva de determinadas proteínas, tales como la corticotrofina y la β -lactamasa. La modificación de los anticuerpos oxidados con peryodato no inactiva típicamente el anticuerpo. La modificación de la concentración del peryodato sódico durante la reacción de oxidación proporciona cierta especificidad con respecto a los tipos de residuos sacáridos que se modifican. Por ejemplo, el peryodato sódico a una concentración de 1 mM a 0°C típicamente corta únicamente en los hidroxilos contiguos entre los átomos de carbono 7, 8 y 9 de residuos de ácido siálico. La oxidación de polisacáridos utilizando concentraciones de 10 mM o superiores de peryodato sódico resulta en la oxidación de residuos sacáridos diferentes del ácido siálico, creando de esta manera muchos aldehídos en un polisacárido dado. Se ha descrito un protocolo general adecuado en Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8. Otro método para introducir aldehídos en moléculas biológicas es mediante la utilización de sacárido oxidasas específicas, por ejemplo galactosa oxidasa, que es un enzima que oxida residuos de galactosa terminales en aldehídos, particularmente en glucoproteínas. En el caso de que los residuos galactosa sean penúltimos tras residuos de ácido siálico, puede utilizarse neuramidasa para eliminar el residuo de ácido siálico y exponer la galactosa para que sea el residuo terminal. Un protocolo para utilizar una combinación de neuramidasa y galactosa oxidasa para oxidar los residuos de galactosa para proporcionar un grupo aldehído reactivo se proporciona en Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8. También pueden introducirse aldehídos en una molécula haciendo reaccionar un grupo amina de una molécula con un NHS-aldehído, tal como p-formilbenzoato de succinimidilo (SFB) o p-formilfenoxiacetato de succinimidilo (SPPA) (Invitrogen Corp., Eugene, OR). Alternativamente, pueden utilizarse compuestos bis-aldehído, tales como glutaraldehído, para modificar un grupo amino para proporcionar un grupo aldehído. Nuevamente se proporcionan protocolos adecuados en Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8.

La expresión "conector hidrazida tiol" se refiere a una molécula que incluye uno o más grupos hidrazida y uno o más grupos tiol (-SH) unidos covalentemente mediante uno o más átomos de unión. El grupo o grupos hidrazida y el grupo o grupos tiol de un conector hidrazida tiol pueden unirse mediante uno o más de entre diversos grupos de átomos, entre ellos los grupos metileno (-CH₂-), los grupos de alquileo ramificado, los grupos hidrazida adicionales, los grupos aromáticos, los grupos heteroaromáticos, los grupos alicíclicos, los grupos de polialquilenglicol (tales como los grupos de óxido de etileno, -O-CH₂CH₂-), los grupos amida (-CONH-), los grupos amina (-NH-), los grupos éter (-O-) y las combinaciones de los mismos. Un "conector hidrazida tiol basado en PEG" se refiere a un conector que incluye 1 o más grupos de etilenglicol como parte de su estructura. Un "conector hidrazida tiol multifuncional" se refiere a un conector ramificado que presenta por lo menos un grupo hidrazida, por lo menos un grupo tiol y por lo menos un grupo reactivo adicional, tal como un grupo hidrazida adicional, un grupo tiol adicional o cualquier otro grupo útil para preparar conjugados moleculares. En algunas realizaciones, un conector hidrazida tiol basado en PEG comprende un conector PEG discreto (dPEG), que puede prepararse a partir de materiales de partida de dPEG tales como los dados a conocer en la solicitud de patente US publicación nº 2006/0020134 y puede obtenerse de Quanta Biodesign (Powell, OH). Entre los ejemplos de grupos reactivos adicionales que pueden incluirse en un conector hidrazida tiol polifuncional se incluyen grupos maleimida y ésteres activos, tales como ésteres de N-hidroxisuccinimida, y grupos hidroxilo (-OH). Pueden encontrarse ejemplos adicionales de grupos reactivos en Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8.

El término "muestra" se refiere a cualquier líquido, sustancia (o material) semisólida o sólida en o sobre el cual puede encontrarse presente una diana. En particular, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra obtenida de un material biológico. Entre los ejemplos de muestras biológicas se incluyen muestras de tejido y muestras de citología.

La expresión "molécula de unión específica" se refiere a una molécula que se une específicamente a una segunda molécula. La expresión "se une específicamente" se refiere a que la molécula de unión específica se une a la segunda molécula excluyendo sustancialmente a otras moléculas presentes en una muestra (por ejemplo la constante de unión de la molécula de unión específica es de por lo menos 10² M⁻¹ superior, 10³ M⁻¹ superior, 10⁴ M⁻¹ superior o 10⁵ M⁻¹ superior a una constante de unión para otras moléculas en la muestra). Entre los ejemplos de moléculas de unión específica se incluyen ácidos nucleicos, receptores, anticuerpos, enzimas, lectinas y avidinas. Entre los ejemplos de interacciones de unión específica en las que pueden particular moléculas de unión específica se incluyen la formación de dúplex y tríplex de secuencias de ácidos nucleicos, las interacciones de receptor-ligando (tales como las interacciones de folato-receptor de folato), las interacciones de anticuerpo-antígeno, las interacciones de enzima-sustrato, las reacciones de lectina-sacárido y las interacciones de avidina-biotina (tales como las interacciones de estreptavidina-biotina).

El término "diana" se refiere a cualquier molécula de la que se determina o puede determinarse la presencia, la localización y/o la concentración. Entre los ejemplos de moléculas diana se incluyen proteínas, secuencias de ácidos nucleicos y haptenos, tales como haptenos unidos covalentemente a secuencias de ácidos nucleicos o proteínas. Las moléculas diana se detectan típicamente utilizando uno o más conjugados de una molécula de unión específica y un marcaje detectable.

La expresión "grupo reactivo con tiol" se refiere a un átomo o átomos que pueden reaccionar con y formar un enlace covalente con un grupo tiol. Un grupo reactivo tiol puede ser una parte intrínseca de una molécula o puede introducirse en la molécula mediante reacción con otra u otras moléculas. Entre los ejemplos de grupos reactivos con tiol se incluyen aceptores de Michael no polimerizables, grupos haloacetilo (tales como los grupos bromoacetilo y yodoacetilo), los haluros de alquilo, las maleimidias, las aziridinas, los grupos aciloilo, las vinilsulfonas, las benzoquinonas, los grupos aromáticos que pueden experimentar sustitución nucleofílica, tales como los grupos fluorobenceno (tales como los grupos tetra- y penta-fluorobenceno) y grupos disulfuro tales como los grupos disulfuro piridilo y los tioles activados con reactivo de Ellman. Los ejemplos adicionales de cada uno de dichos tipos de grupos resultarán evidentes para el experto en la materia. Se proporcionan ejemplos adicionales e información sobre las condiciones de reacción y métodos de intercambio de un tipo de grupo reactivo por otro para añadir un grupo reactivo con tiol en Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8. En una realización particular, se une una molécula conectora heterobifuncional a una molécula para introducir un grupo reactivo con tiol. Por ejemplo, un conector que presenta un grupo maleimida y un grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) puede unirse a un grupo amina en una molécula mediante el grupo NHS, proporcionando de esta manera a la molécula un grupo maleimida reactivo con tiol que puede hacerse reaccionar con un grupo tiol de otra molécula (tal como una introducida utilizando un conector hidrazida tiol y el método dado a conocer), formando un conjugado.

III Descripción general

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones.

El experto en la materia reconocerá que el método dado a conocer puede utilizarse para unir cualquier combinación de moléculas que presentan grupos funcionales que pueden reaccionar con un conector hidrazida tiol. La descripción a continuación se centra en los conjugados de anticuerpos, y más particularmente en los conjugados de anticuerpo-enzima. Aunque los conjugados dados a conocer específicamente son conjugados de anticuerpo-enzima, los conjugados entre otras moléculas biológicas (tales como secuencias de ácidos nucleicos) y otros marcajes detectables (tales como haptenos, marcajes fluorescentes, nanopartículas fluorescentes y proteínas fluorescentes, tales como la proteína fluorescente verde) se encuentran contemplados y se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un aspecto se da a conocer un método para formar un conjugado de dos o más moléculas. El método incluye la reacción de un conector hidrazida tiol con una primera molécula (tal como un anticuerpo) que presenta un grupo reactivo con hidrazida (tal como un aldehído) para formar una primera molécula tiolada. La reacción se lleva a cabo bajo condiciones en las que un grupo tiol del conector hidrazida tiol se encuentra sustancialmente presente en su forma ácida neutra (protonada). La primera molécula tiolada seguidamente puede hacerse reaccionar con una segunda molécula que presenta un grupo reactivo con tiol (tal como un grupo maleimida introducido en la segunda molécula) para formar el conjugado. En una realización particular, la reacción de la primera molécula con el conector se lleva a cabo a un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7. En otras realizaciones particulares, el conector hidrazida tiol puede ser un conector hidrazida tiol basado en PEG, un conector hidrazida tiol multifuncional, o un conector hidrazida tiol multifuncional basado en PEG.

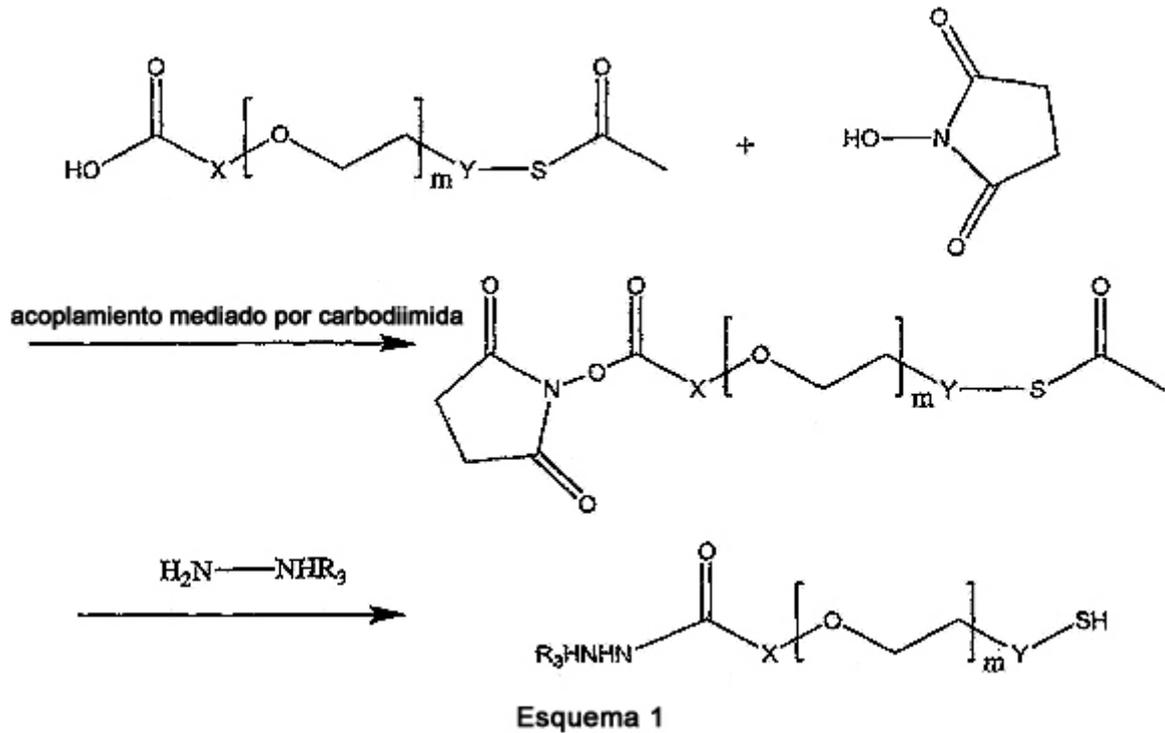
En otra realización, el método puede utilizarse para unir covalentemente una molécula de unión específica a un marcaje detectable. En una realización más particular, el método puede utilizarse para unir una primera molécula que presenta una parte glucosilada a otra molécula. En dicha realización, la parte glucosilada en primer lugar se oxida para generar un grupo aldehído que puede hacerse reaccionar con un conector hidrazida tiol. En una realización todavía más particular, la primera molécula glucosilada puede ser un anticuerpo que presenta una región Fc glucosilada. Se forma un anticuerpo tiolado específico para Fc mediante reacción con un conector hidrazida tiol, y el anticuerpo tiolado específico para Fc puede hacerse reaccionar con un marcaje detectable que presenta un grupo reactivo con tiol.

En otro aspecto se proporciona una diversidad de conectores hidrazida tiol y métodos para la preparación de los mismos, tal como se describe de manera general en la descripción general sintética y en los Ejemplos específicos, posteriormente. Un aspecto adicional es un conjugado preparado con un conector dado a conocer. En un aspecto adicional, se da a conocer un kit que incluye un conector dado a conocer e instrucciones para poner en práctica el método dado a conocer de preparación de un conjugado. Se dan a conocer además métodos para utilizar los conjugados dados a conocer para detectar una diana en una muestra.

IV. Descripción general sintética

A. Preparación de conector hidrazida tiol

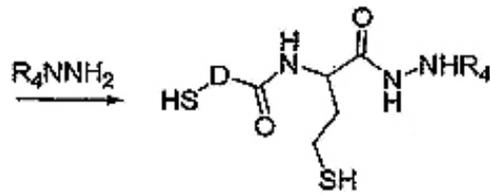
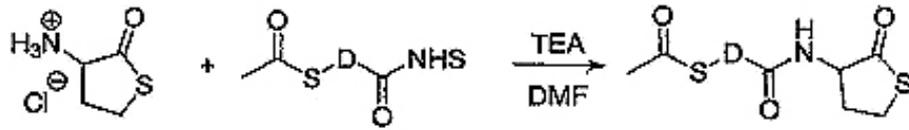
En la presente invención se proporciona un conector hidrazida tiol basado en PEG que puede utilizarse en los métodos dados a conocer y se prepara según el Esquema 1. En el Esquema 1, $m=2$ a 50 , R^3 es H, $-\text{CONHNH}_2$ o $-\text{CO-A-CONHNH}_2$, en el que A es un grupo divalente que presenta entre 1 y 100 átomos de carbono que pueden estar interrumpidos por uno o más heteroátomos (por ejemplo O, N o S) y puede sustituirse con, por ejemplo, uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina, y X e Y son independientemente un enlace o un grupo divalente que presenta entre 1 y 20 átomos de carbono. En realizaciones más particulares, A es un grupo divalente que consiste de 1 a 10 grupos metileno ($-\text{CH}_2$) y/o 1 a 24 grupos de óxido de etileno ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$). En realizaciones todavía más particulares, A es un grupo divalente que consiste de 1 a 6 grupos metileno o 4 a 12 grupos de óxido de etileno. Los grupos divalentes X e Y pueden interrumpirse con uno o más heteroátomos (por ejemplo O, N o S) y pueden sustituirse, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En realizaciones más particulares, X e Y son, independientemente, un enlace o $-(\text{CH}_2)_p$, en el que $p=1$ a 3. La carbodiimida utilizada en la reacción de acoplamiento puede ser cualquier carbodiimida que proporcione el acoplamiento deseado según el esquema. Entre los ejemplos de carbodiimidias adecuadas se incluyen DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) y DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida). En una realización de trabajo que se comenta posteriormente, se utiliza DCC para llevar a cabo el acoplamiento.



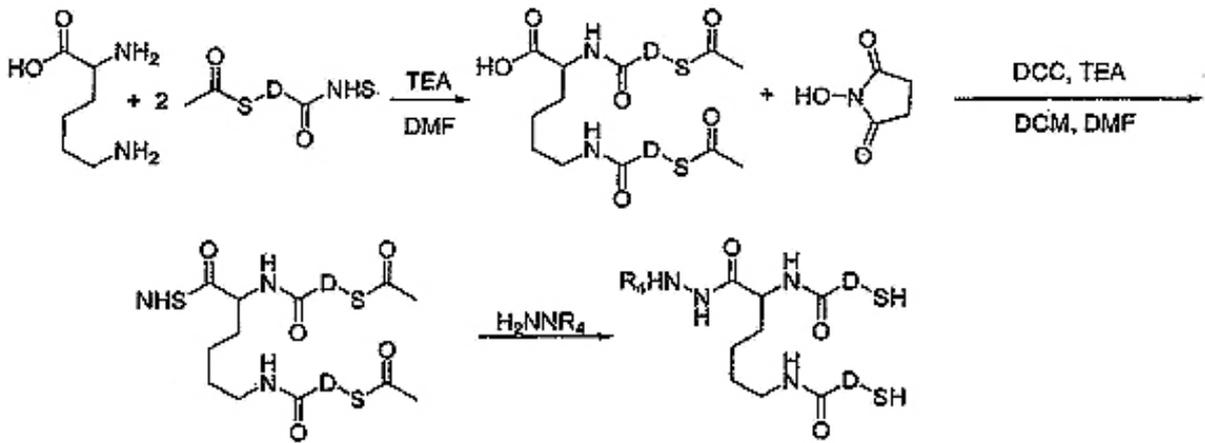
5 También se describe un conector hidrazida tiol multifuncional. Los Esquemas 2a, 2b, 2c y 2d, posteriormente, muestran métodos generales para preparar conectores multifuncionales a partir de homocisteína, lisina, ácido glutámico y homoserina, respectivamente. En los Esquemas 2a, 2b, 2c y 2d, D es un grupo divalente que presenta entre 1 y 100 átomos de carbono, en el que el grupo divalente puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos (por ejemplo O, N o S) y puede sustituirse, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En realizaciones más particulares, D es un grupo divalente que consiste de 1 a 10 grupos metileno (-CH₂) y/o 1 a 24 grupos de óxido de etileno (-CH-CH₂-O-). En realizaciones todavía más particulares, D es un grupo divalente que consiste de 1 a 6 grupos metileno o 4 a 12 grupos de óxido de etileno. También en los Esquemas 2a, 2b, 2c y 2d, R⁴ es H, -CONHNH₂ o -CO-A-CONHNH₂, en donde A es un grupo divalente que presenta entre 1 y 100 átomos de carbono que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos (por ejemplo O, N o S) y puede sustituirse, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En realizaciones más particulares, A es un grupo divalente que consiste de 1 a 10 grupos metileno (-CH₂) y/o 1 a 24 grupos de óxido de etileno (-CH-CH₂-O-). En realizaciones todavía más particulares, A es un grupo divalente que consiste de 1 a 6 grupos metileno o 4 a 12 grupos de óxido de etileno.

10

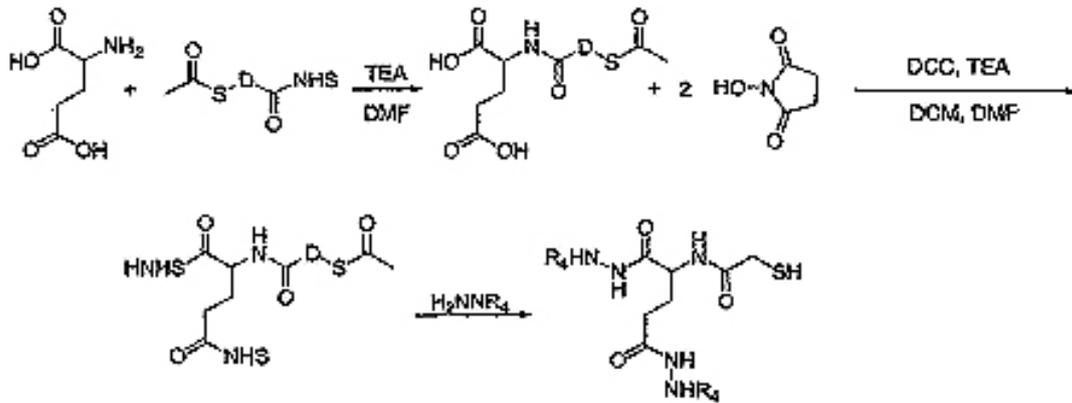
15



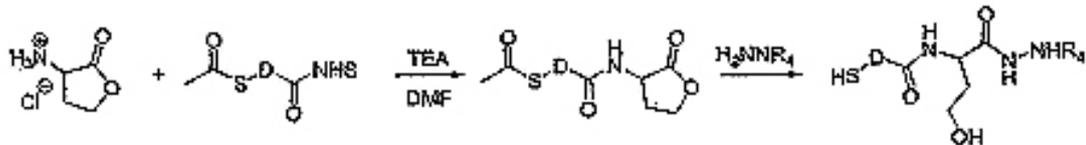
Esquema 2a



Esquema 2b

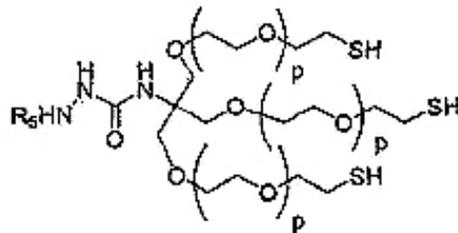
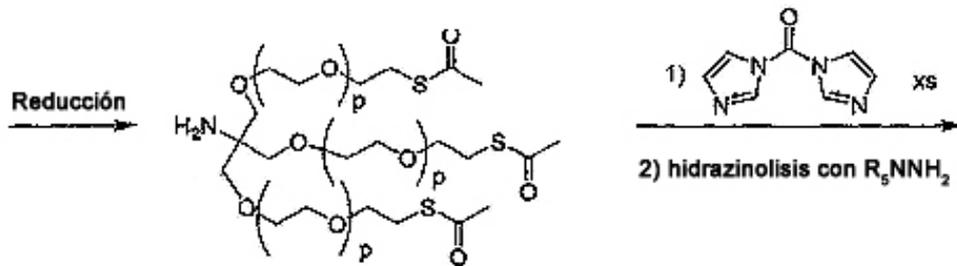
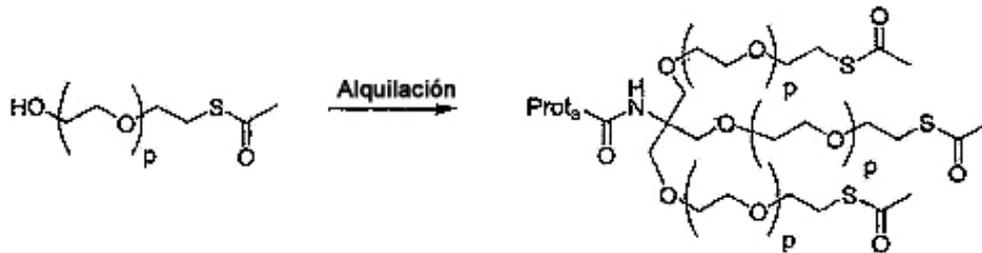
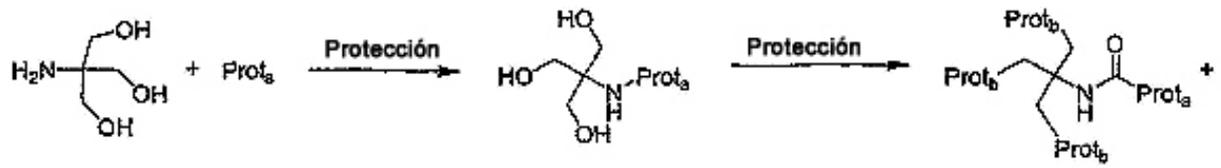


Esquema 2c

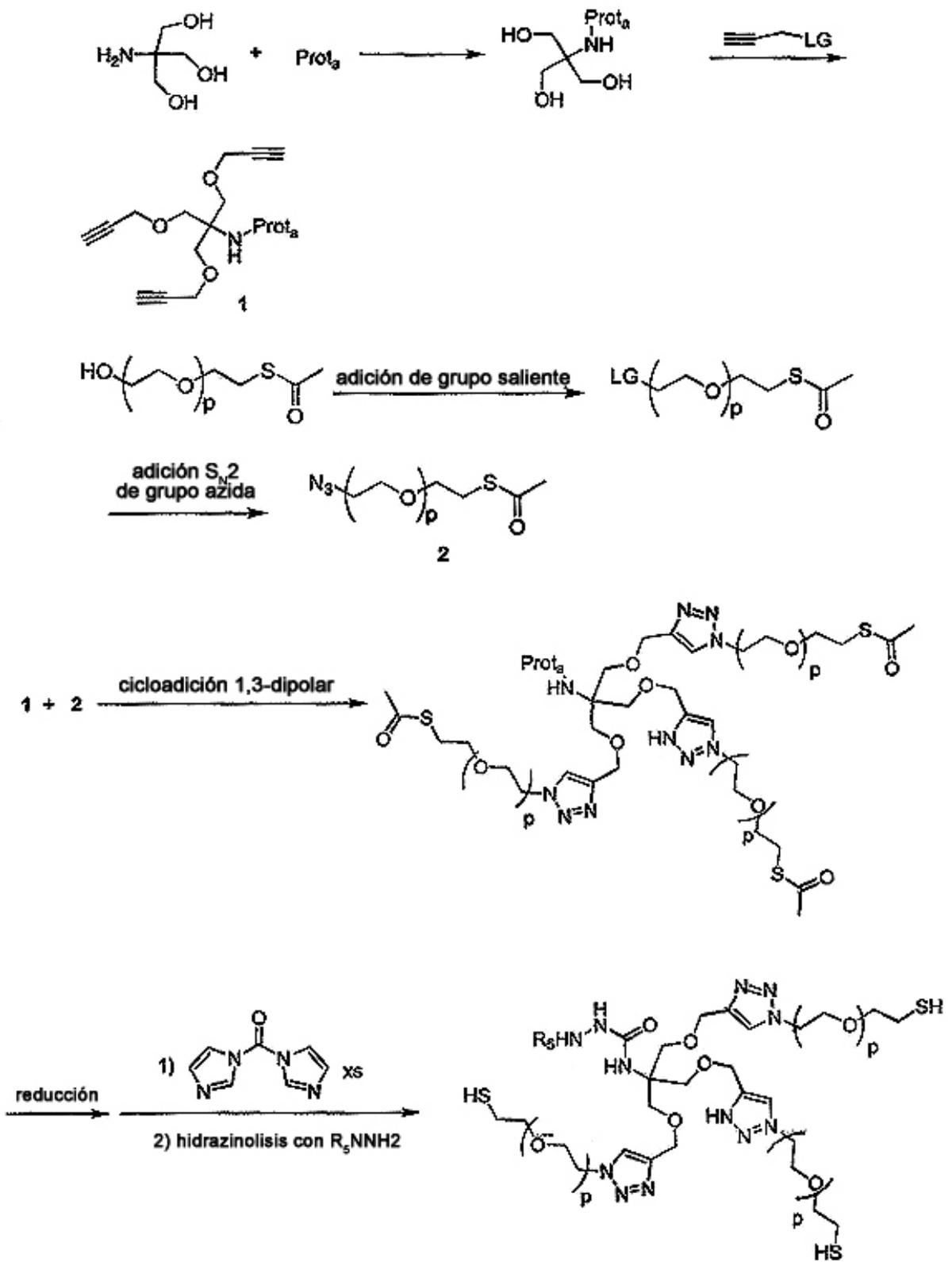


Esquema 2d

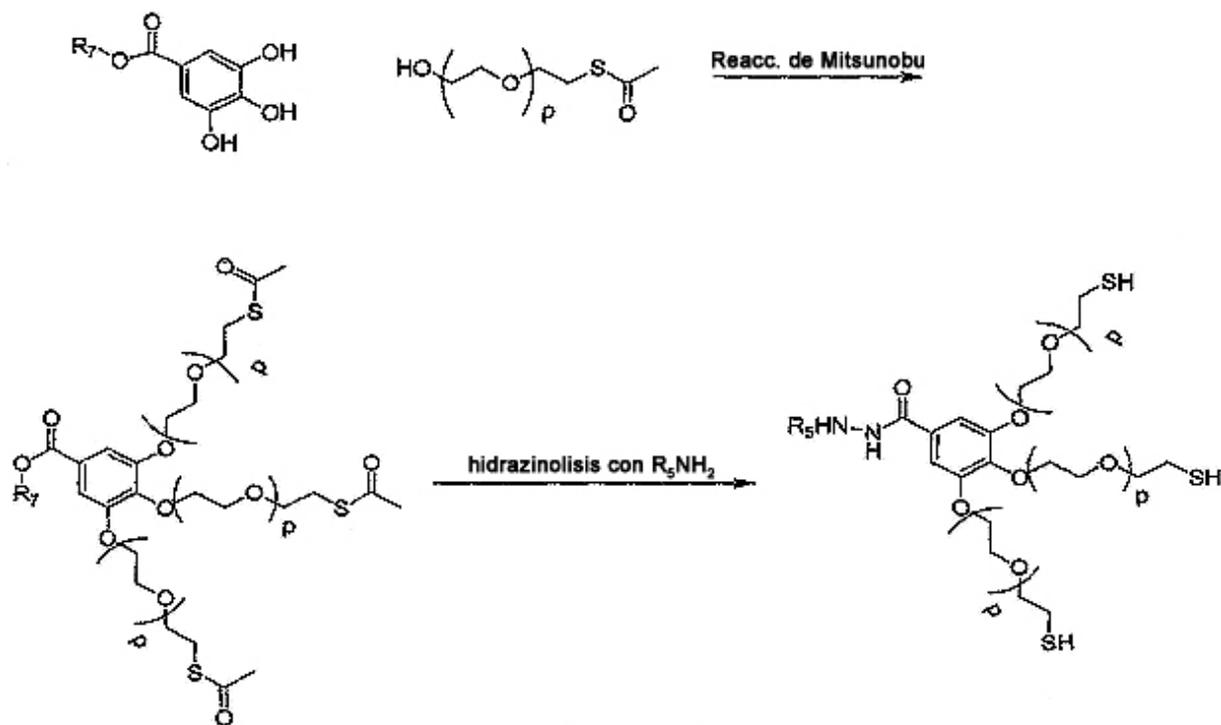
También se describe un conector hidrazida tiol multifuncional. Los Esquemas 3a, 3b y 3c ilustran esquemas sintéticos generales que pueden utilizarse para proporcionar dichos conectores. En dichos esquemas, p=2 a 50 y R⁵ es H, -CONHNH₂ o -CO-A-CONHNH₂, en donde A es un grupo divalente que presenta entre 1 y 100 átomos de carbono que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos (por ejemplo O, N o S) y puede sustituirse, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En realizaciones más particulares, A es un grupo divalente que consiste de 1 a 10 grupos metileno (-CH₂) y/o 1 a 24 grupos de óxido de etileno (-CH-CH₂-O-). En realizaciones todavía más particulares, A es un grupo divalente que consiste de 1 a 6 grupos metileno o 4 a 12 grupos de óxido de etileno. R⁷ puede ser H, alquilo o un grupo protector.



Esquema 3a

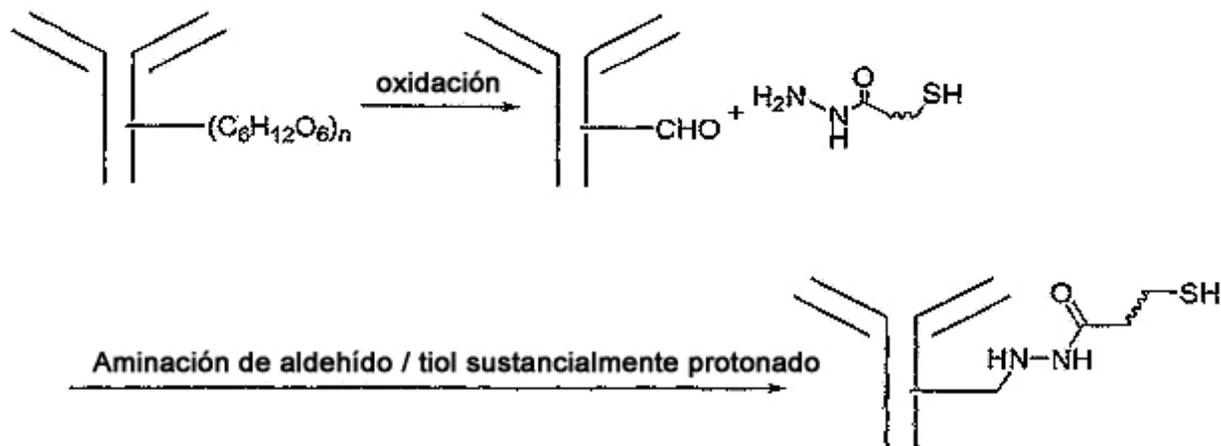


Esquema 3b



B. Preparación de conjugados de anticuerpo específico para Fc

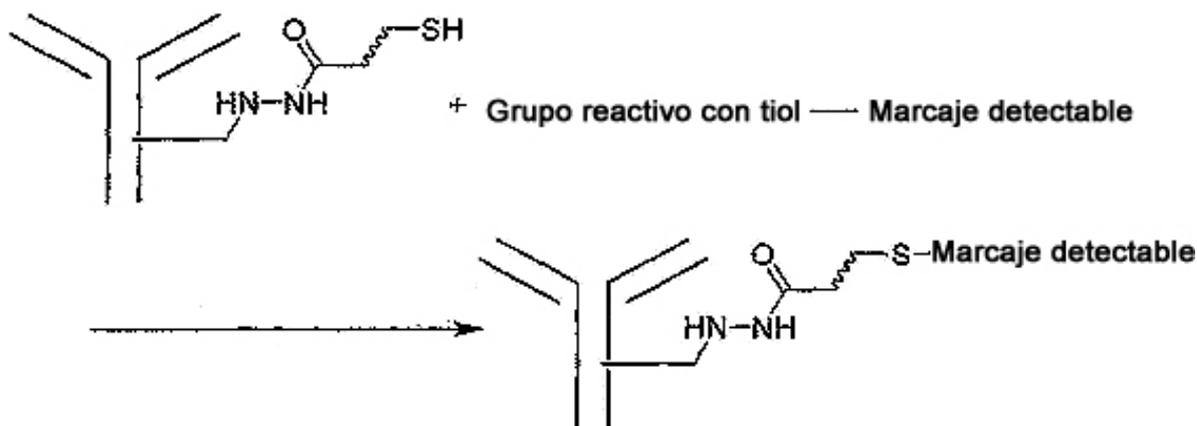
- 5 En una realización, un conjugado que incluye un conector hidrazida tiol comprende un conjugado de un anticuerpo y un marcaje detectable. En una realización particular, el conjugado comprende un conjugado específico para Fc de un anticuerpo y un marcaje detectable. En una realización particular, el conjugado comprende un conjugado específico para Fc de un anticuerpo y un enzima, tal como fosfatasa alcalina. El Esquema 4 ilustra un método para añadir un conector hidrazida tiol a un anticuerpo de una manera específica para Fc.



- 10
- 15 En el Esquema 6, un anticuerpo que presenta una parte Fc glucosilada se oxida de manera específica de sitio, generando uno o más grupos aldehído en las fracciones sacáridas de la parte Fc glucosilada. El grupo o grupos aldehído seguidamente se hacen reaccionar con un conector hidrazida tiol bajo condiciones en las que el grupo tiol del conector hidrazida tiol se encuentra sustancialmente protonado (sustancialmente en su forma de ácido neutro). Bajo dichas condiciones, el grupo hidrazida del conector se une covalentemente a la parte Fc del anticuerpo, dejando simultáneamente el grupo tiol sustancialmente no reaccionado (tal como sustancialmente no reaccionado con enlaces disulfuro en el anticuerpo) y, de esta manera, conservado para la reacción posterior con una segunda

molécula que presente un grupo reactivo con tior, tal como un marcaje detectable que presente un grupo reactivo con tior. La reacción incluye deseablemente una reacción posterior con un reductor suave (un ejemplo de una aminación reductora), formando una hidrazona más estable. El acoplamiento del anticuerpo tiorado con un marcaje detectable que presenta un grupo reactivo con tior (tal como un grupo maleimida) se ilustra en el Esquema 5.

5



V. Ejemplos

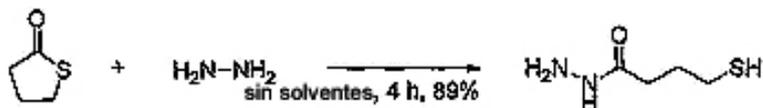
Se proporcionan los ejemplos siguientes de realizaciones de trabajo con el fin de ilustrar adicionalmente determinados aspectos de la invención.

10

Ejemplo de referencia 1 - Síntesis de hidrazida de ácido mercaptobutírico (MBH)

15

En un ejemplo particular que no forma parte de la invención, se preparó un conector hidrazida tior a partir de γ -butirotiolactona según el Esquema 6.



20

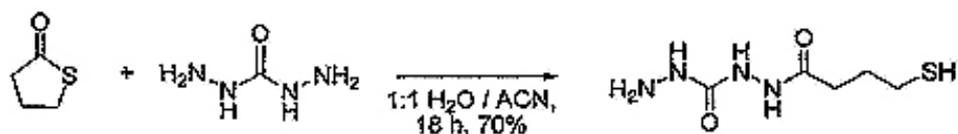
En particular, a una solución bajo agitación de monohidrato de hidrazina (2,43 ml, 50 mmoles) se añadió lentamente γ -butirotiolactona (0,43 ml, 5 mmoles). Tras 4 horas, se eliminó al vacío el exceso de hidrazina. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash (SiO_2 , MeOH/MeCN 1:19), proporcionando el producto deseado en forma de un aceite incoloro. Rendimiento: 599 mg (89%): RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 7,56 (s, 1 H), 3,89 (s, 2 H), 2,56-2,47 (q, $J = 6,9$ Hz, 2 H), 2,28-2,22 (t, $J = 7,0$ Hz, 2 H), 1,94-1,83 (p, $J = 7,0$ Hz, 2 H), 1,35-1,29 (t, $J = 8,0$ Hz, 1 H); RMN ^{13}C (62,9MHz, CDCl_3) δ 173,02, 32,38, 29,16, 23,94; EMAR-IEP m/z 135,05955 ($M + H^+$, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OS}$ calc. 135,05921).

25

Ejemplo de referencia 2 - Síntesis de carbohidrazida de ácido mercaptobutírico (MBCH)

30

En otro ejemplo particular que no forma parte de la invención, se preparó un conector carbohidrazida tior a partir de γ -butirotiolactona según el Esquema 7.

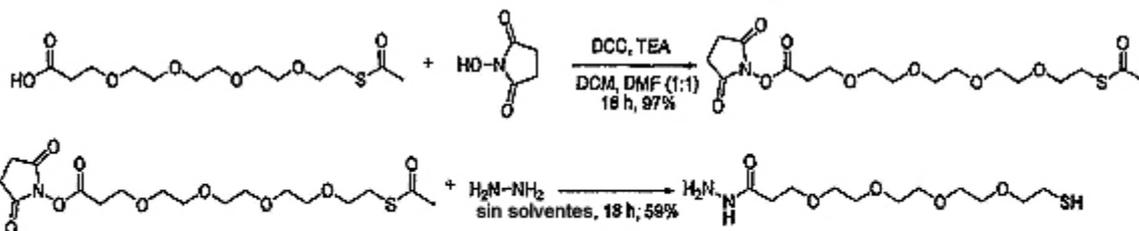


Esquema 7

En particular, se diluyó γ -butirolactona (0,43 ml, 5 mmoles) en acetonitrilo (5 ml) y después se añadió lentamente a una solución de carbohidrazida (2,25 g, 25 mmoles) en agua desionizada (5 ml). La reacción se agitó a 40°C durante 18 h y después se concentró al vacío. Se separó el producto en bruto mediante filtración con acetonitrilo y cromatografía flash (SiO₂, MeCN/MeOH 1:19), proporcionando el producto en forma de un sólido blanco. Rendimiento: 672 mg (70%): RMN ¹H (250 MHz, D₂O) δ 2,62-2,56 (t, J= 7,1 Hz, 2 H), 2,47-2,41 (t, J= 7,4 Hz, 2 H), 1,98-1,87 (m, 2 H); ¹³C NMR (62,9 MHz, D₂O) δ 179,14, 163,94, 34,86, 31,74, 25,91; EMAR-IEP m/z 215,05818 (M + Na⁺, C₅H₁₂N₄NaO₂S calc, 215,25787).

Ejemplo 3 - Síntesis de mercapto-dPEG₄-hidrazida

En una realización de trabajo particular, se preparó un conector hidrazida tiol basado en PEG según el Esquema 18, proporcionando hidrazida de mercapto-dPEG.

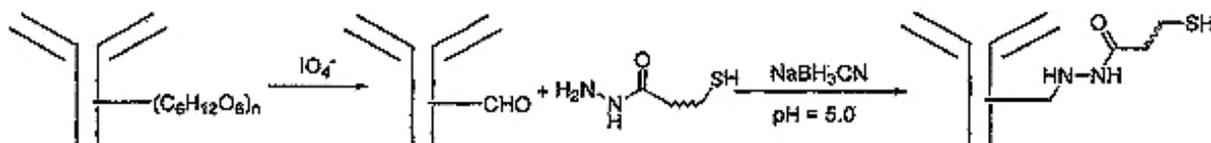


Esquema 8

Se añadió lentamente éster de acetil-S-dPEG₄TM-NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH; 580 mg, 1,38 mmoles) a hidrazina anhidra (10 ml) y se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. La reacción se concentró al vacío, proporcionando el producto en bruto. La cromatografía flash (SiO₂, MeCN/AcOH 199:1) proporcionó el producto en forma de un aceite incoloro. Rendimiento: 240 mg (59%): RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 8,04 (s, 1 H), 3,88 (s, 2 H), 3,68-3,52 (m, 17 H), 2,65-2,60 (t, J= 6,3 Hz, 2 H), 2,43-2,39 (t, J= 5,8 Hz, 2 H); ¹³C NMR (62,9 MHz, CDCl₃) δ 171,94, 72,74, 70,52, 70,49, 70,38, 70,15, 70,09, 66,72, 35,17, 24,12; EMAR-IEP m/z 319,13073 (M + Na⁺, C₁₁H₂₄N₂NaO₅S calc. 319,13036). También se encuentra disponible comercialmente un éster de acetil-S-dPEG₈TM-NHS de Quanta Biodesign (Powell, OH). En general, un mercapto-dPEG-hidrazida puede presentar la fórmula H₂N-NH-CO-(CH₂-CH₂-O)_t-CH₂-CH₂-SH, en la que t=2 a 50.

Ejemplo 4 - Síntesis de conjugados de IgG y fosfatasa alcalina

Se preparó una inmunoglobulina específicamente tiolada en Fc, según el Esquema 9.



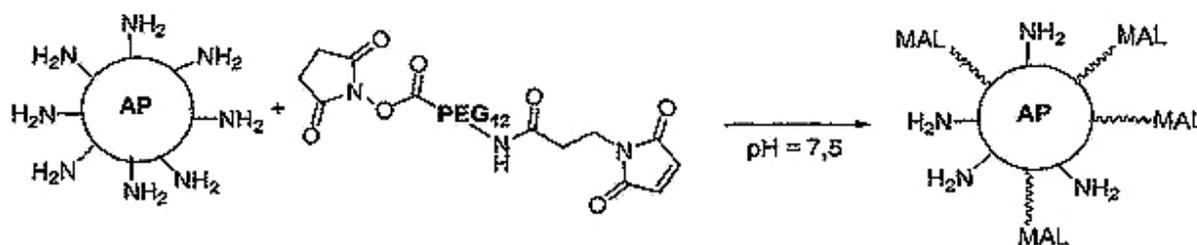
Esquema 9

Concretamente, a una solución de anticuerpo policlonal (1,5 ml, 3,0 mg/ml) se añadió peryodato sódico (0,5 ml, 10 mg/ml en agua desionizada) para una concentración final de peryodato de 11,7 mM. La solución de reacción se agitó mediante rotación durante 2 horas antes de pasarla a través de una columna de desalación PD-10 (NaOAc 0,1 M, EDTA 1 mM, pH=5,0) para eliminar el exceso de peryodato. Se añadió un conector hidrazida tiol (MBH, AMBH, MBCH o mercapto-dPEG₄-hidrazida) en un exceso molar de 1.000 veces al anticuerpo, seguido de cianoborohidruro

sódico (3,14 mg, 50 mmoles) y la reacción se agitó mediante rotación durante un periodo de 18 h antes de concentrarla hasta un volumen final de 1 ml. La cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; NaOAc 0,1 M, pH=5,0) proporcionó el anticuerpo tiolado purificado. Se cuantificó el número de tioles mediante un ensayo de Ellman modificado (ver, por ejemplo, Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8). Dicho procedimiento rindió una media de 3 a 5 grupos tiol por cada anticuerpo.

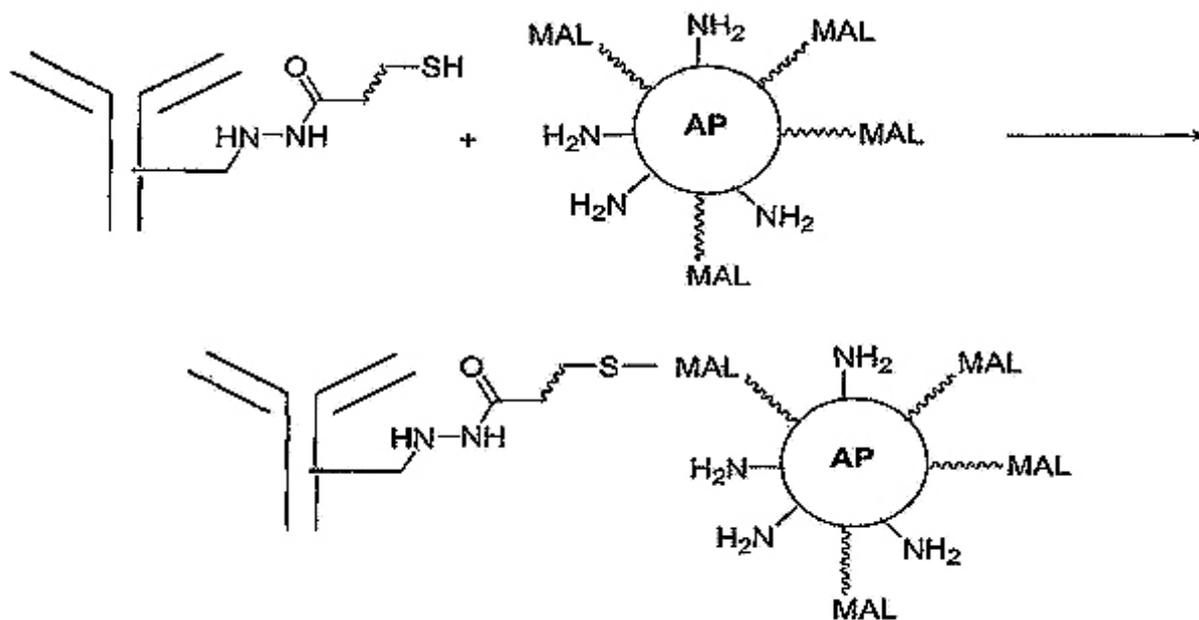
La reacción de un conector hidrazida tiol con un grupo aldehído introducido en la región Fc de una inmunoglobulina se llevó a cabo ventajosamente a un pH levemente ácido, por ejemplo a un pH de entre 4 y 6, tal como un pH de 5. Sin respaldo teórico, es probable que a dichos pH levemente ácidos, el grupo aldehído resulte electrofílicamente activado mediante protonación del oxígeno del aldehído y, concurrentemente, el grupo hidrazida (pKa de aproximadamente 4) no resulte sustancialmente protonado y se mantenga altamente nucleofílico, facilitando de esta manera la reacción entre el grupo aldehído y el grupo hidrazida. Debido a que dichas condiciones levemente ácidas también representan condiciones en las que el azufre del grupo tiol se encuentra sustancialmente protonado (sustancialmente presente en su forma de ácido neutro) y, de esta manera, incapaz de reaccionar con disulfuros que unen las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina, la reacción es fácil y, sin embargo, menos probable que altere la estructura de la inmunoglobulina. Además, se mantiene un grupo tiol libre para la reacción posterior de formación de un conjugado.

Se expusieron grupos maleimida reactivos con tiol a la fosfatasa alcalina siguiendo el Esquema 10.



Concretamente, se pasó la fosfatasa alcalina (Biozyme, San Diego, CA), dentro de un tampón reactivo que contenía Tris, a través de una columna PD-10 con el fin de intercambiar la FA en un tampón no reactivo (fosfato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,1 M, cloruro de magnesio 1 mM, cloruro de cinc 0,1 mM, pH=7,5). A continuación, a una solución de fosfatasa alcalina (0,8 ml, 17,5 mg/ml) se añadió un exceso de 100 veces de NHS-dPEG₁₂-MAL (Quanta Biodesign, Powell, OH) y la reacción se agitó mediante rotación durante un periodo de 1 h. La cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, Tris 0,1 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, pH=7,5) rindió la maleimido-fosfatasa alcalina purificada. Se cuantificó el número de maleimidias utilizando un ensayo de Ellman (ver, por ejemplo, Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8) y de media se introdujeron 17 a 25 grupos maleimida en cada enzima fosfatasa alcalina.

A continuación, se llevó a cabo la conjugación final del antic. tiolado y la FA reactiva a un pH superior a 7, que en este caso permitió la formación rápida de un conjugado mediante reacción del tiol en el antic. (presente en mayor grado en la forma tiolato de la base conjugada a pH más altos) y el grupo maleimida reactivo con tiol introducido en la fosfatasa alcalina. El Esquema 11 a continuación ilustra la conjugación final del antic. tiolado y la FA reactiva con tiol.



Esquema 11

Concretamente, se combinó la maleimido-fosfatasa alcalina purificada con el anticuerpo tiolada purificada en una proporción molar 1:1 y se agitó mediante rotación durante un periodo de 18 h. La cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, Tris 0,1 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, pH=7,5) proporcionó el conjugado purificado, que se diluyó a una A₂₈₀=0,0087 en una dilución 1:1 de diluyente Stabilzyme™ estabilizador del enzima FA (SurModics, Eden Prairie, MN) y se analizó en tejido tal como se indica en los ejemplos, posteriormente. Los conjugados resultantes mostraron sensibilidades de tinción sin precedentes en una diversidad de tejidos, tal como se muestra en los Ejemplos siguientes.

La síntesis del conjugado de antic.-FA según el presente procedimiento produjo un conjugado 1:1 que presentaba una mediana de peso molecular de aproximadamente 270 kDa. Lo anterior es cierto con independencia del anticuerpo utilizado para preparar el conjugado (tal como los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón, de cabra anti-IgG de conejo y de conejo anti-DNP). Los cromatogramas en bruto, obtenidos tras la conjugación, mostraban un solapamiento entre el producto y el material de partida (mediana de peso molecular: 145 kDa), que puede tomarse en consideración durante el procedimiento de purificación.

Ejemplo de referencia 5 - Detección de kappa en tejido de amígdala

En el presente ejemplo, se evaluó el rendimiento de un conjugado antic.-FA preparado utilizando MBH según el procedimiento del Ejemplo 4, para su sensibilidad de detección en un ensayo de hibridación *in situ* (ISH). El procedimiento utilizado se adaptó a partir de un protocolo de ISH estándar disponible en un instrumento automático de tinción de portaobjetos BenchMark® (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). El protocolo de tinción automático fue el siguiente.

Una muestra de tejido de amígdala incluido en parafina en un portaobjetos se calentó a 75°C durante 4 minutos y se trató dos veces con ajuste de volumen de EZPrep™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) a 75°C antes de la aplicación de LiquidCoverslip™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) con ajuste de volumen EZPrep™. Tras 4 minutos a 75°C, el portaobjetos se enjuagó y se añadió ajuste de volumen EZPrep™ conjuntamente con LiquidCoverslip™ para desparafinar el tejido a 76°C durante 4 minutos. Se dispensó un cubreobjetos líquido para cubrir la EZ-Prep. A continuación se calentó el portaobjetos a 90°C durante 4 minutos y se enjuagó antes de enfriar a 37°C. Se añadió ISH-proteasa 1 (100 ml, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se incubó durante 2 minutos y después se enjuagó, seguido de la adición de una sonda de ácidos nucleicos kappa marcada con fluoresceína (100 µl, INFORM® Kappa, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras una incubación de 4 minutos, el portaobjetos se calentó a 85°C durante 12 minutos, después se enfrió a 47°C y se incubó durante 64 minutos adicionales. El portaobjetos se enjuagó cuatro veces antes de la adición de un anticuerpo primario de ratón anti-fluoresceína (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), que se incubó durante 20 minutos y después se enjuagó dos veces. En este punto se añadió automáticamente un anticuerpo secundario (para la amplificación posterior) o se añadió el conjugado antic.-FA manualmente o automáticamente desde un dispensador. A los

portaobjetos que habían sido amplificados, se añadió un anticuerpo de conejo anti-ratón (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), que se incubó durante 8 minutos y después se enjuagó el portaobjetos dos veces. En cualquier caso, tras aplicar en el portaobjetos el conjugado de FA-antic. (conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo o de conejo anti-IgG de ratón, para muestras con y sin el anticuerpo secundario, respectivamente; 100 µl), el portaobjetos se incubó durante 16 minutos y el portaobjetos se enjuagó dos veces. Tras la aplicación del intensificador View™ Blue Enhance (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) se llevó a cabo la incubación durante 4 minutos y se aplicó tanto iView™ Blue NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) e iView™ Blue BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). BCIP, que es un sustrato de la fosfatasa alcalina genera un precipitado insoluble azul oscuro/violeta y NBT intensifica el color de BCIP. A continuación se incubó el portaobjetos durante un periodo de 32 minutos, se enjuagó dos veces y se añadió contratinción NFR (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras la incubación con la contratinción durante 6 minutos, el portaobjetos se enjuagó nuevamente y se extrajo del instrumento. El portaobjetos se trató con un lavado de detergente antes de la deshidratación con la serie etanol, acetona seguido de xileno. Se añadió un cubreobjetos al portaobjetos y éste se observó y fotografió a través de un microscopio. También se preparó de una manera similar un portaobjetos de control negativo que no había sido tratado con la sonda kappa.

Para la comparación se tiñó una muestra de tejido de amígdala de referencia utilizando un procedimiento similar, utilizando un conjugado de SA-FA para la detección de la sonda kappa (el procedimiento incluía la adición del anticuerpo secundario, tal como anteriormente, seguido de etapas adicionales de amplificación, en las que se llevó a cabo la adición automatizada de un anticuerpo anti-IgG biotinilado en lugar de la aplicación del conjugado antic.-FA, seguido de la adición del conjugado SA-FA). La utilización de anticuerpos marcados con biotina y conjugados SA-FA es un estándar de la industria para la detección en métodos automatizados de tinción de ISH y sirvió como referencia para determinar el rendimiento relativo del conjugado antic.-FA. También se preparó de una manera similar utilizando la detección de SA-FA un portaobjetos de control negativo con la sonda kappa. Se añadieron cubreobjetos a los portaobjetos y estos se observaron y fotografiaron a 40X mediante un microscopio de campo brillante.

La FIG. 1 es un grupo de fotomicrografías que compara la tinción deseada y la tinción de fondo observadas para la detección ISH de kappa en tejido de amígdala utilizando el conjugado de anticuerpo-fosfatasa alcalina y el conjugado SA-FA. En la FIG. 1A se muestra la tinción de kappa sin amplificación proporcionada por el anticuerpo secundario y utilizando el conjugado de anticuerpo dado a conocer. La FIG. 1B muestra un portaobjetos de control negativo tratado con el conjugado. La FIG. 1C muestra la tinción de kappa utilizando SA-FA y la FIG. 1D muestra el control negativo para el mismo. Una comparación entre las FIGS. 1A y 1C muestra una tinción más definida con el conjugado de anticuerpo (aunque se utilizaron menos etapas de amplificación), y una comparación de las FIGS. 1B y 1D muestra el fondo menor proporcionado por el conjugado de anticuerpo. Estos resultados ilustran la superioridad del esquema de detección sin biotina que permite el conjugado de anticuerpo.

Ejemplo de referencia 6 - Detección de lambda en tejido de amígdala

El procedimiento de tinción automatizado descrito en el Ejemplo 5 (con las excepciones de que la sonda de ácidos nucleicos marcada con fluoresceína utilizada era específica para Lambda; INFORM® Lambda, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ; y proteasa ISH 1 se incubaron durante 4 minutos) se utilizó para evaluar el rendimiento de un conjugado antic.-FA para la detección de lambda en tejido de amígdala. Se utilizó el conjugado Antic.-FA sin una etapa de amplificación de anticuerpo secundario y se preparó utilizando MBH tal como se indica en el Ejemplo 4. Para la comparación se preparó un portaobjetos de referencia utilizando el esquema de detección del conjugado SA-FA descrito en el Ejemplo 4.

Se presentan los resultados en la fig. 2. Concretamente las FIGS. 2A y 2B muestran el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado Antic.-FA con y sin (control negativo) la adición de la sonda de ácidos nucleicos específica para Lambda, respectivamente. Las FIGS. 2C y 2D muestran el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado SA-FA con y sin (control negativo) adición de la sonda Lambda, respectivamente. Una comparación entre las FIGS. 2A y 2C muestra que el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado antic.-FA es por lo menos tan intenso como el observado con el conjugado SA-FA, a pesar de que el procedimiento utilizado para el conjugado antic.-FA incluye una etapa de amplificación menos. Una comparación entre las FIGS. 2B y 2D demuestra que existe una tinción de fondo mucho menor (puesta de manifiesto por una tinción global más intensa del tejido) del conjugado antic.-FA. Nuevamente estos resultados demuestran la reducción ventajosa del fondo observado al utilizar el conjugado antic.-FA dado a conocer.

Ejemplo de referencia 7 - Detección del CMV en tejido pulmonar

El procedimiento de tinción automatizado descrito en el Ejemplo 5 (con las excepciones de que la sonda de ácidos nucleicos marcada con fluoresceína utilizada era específica para el CMV; INFORM® Lambda, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ; y proteasa ISH 1 se incubaron durante 4 minutos) se utilizó para evaluar el rendimiento

de un conjugado antic.-FA para la detección del CMV en tejido pulmonar. Se utilizó el conjugado Antic.-FA sin una etapa de amplificación de anticuerpo secundario y se preparó utilizando MBH tal como se indica en el Ejemplo 4. Para la comparación se preparó un portaobjetos de referencia utilizando el esquema de detección del conjugado SA-FA descrito en el Ejemplo 4.

5 Se presentan los resultados en la FIG. 3. Concretamente la FIG. 3A muestra el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado antic.-FA en presencia de la sonda. La FIG. 3B muestra el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado antic.-FA en ausencia de la sonda. La FIG. 3C muestra el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado SA-FA en presencia de la sonda y la FIG. 3D muestra el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado SA-FA en ausencia de la sonda. Una comparación de FIGS. 3A y 3C muestra que la tinción con el conjugado antic.-FA es más definida y por lo menos igual de intensa (a pesar de presentar una etapa de amplificación menos) que la tinción proporcionada por el conjugado SA-FA. Además, se observa menor tinción de fondo para el conjugado antic.-FA. La reducción de fondo proporcionada por el conjugado antic.-FA también resulta evidente a partir de una comparación entre las FIGS. 3B y 3D.

15 Ejemplo de referencia 8 - Detección de EBER en tejido de bazo

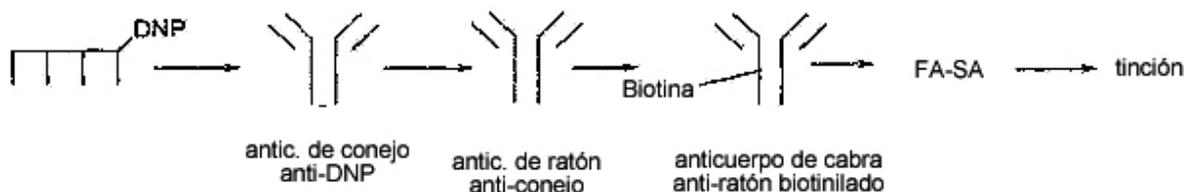
El procedimiento de tinción automatizado descrito en el Ejemplo 5 (con las excepciones de que la sonda de ácidos nucleicos marcada con fluoresceína utilizada era específica para EBER; INFORM® EBER, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ; y proteasa ISH 1 se incubaron durante 4 minutos) se utilizó para evaluar el rendimiento de un conjugado antic.-FA para la detección de EBER en tejido de bazo. Se utilizó el conjugado Antic.-FA sin una etapa de amplificación de anticuerpo secundario y se preparó utilizando MBH tal como se indica en el Ejemplo 4. Para la comparación se preparó un portaobjetos de referencia utilizando el esquema de detección del conjugado SA-FA descrito en el Ejemplo 4.

25 Se presentan los resultados en la FIG. 4. Concretamente la FIG. 4A muestra el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado antic.-FA en presencia de la sonda. La FIG. 4B muestra el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado antic.-FA en ausencia de la sonda. La FIG. 4C muestra el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado SA-FA en presencia de la sonda y la FIG. 4D muestra el patrón de tinción obtenido utilizando el conjugado SA-FA en ausencia de la sonda. Una comparación de las FIGS. 4A y 4C muestra que la tinción con el conjugado antic.-FA es más definida y por lo menos igual de intensa (a pesar de presentar una etapa de amplificación menos) que la tinción proporcionada por el conjugado SA-FA. Además, se observa menor tinción de fondo para el conjugado antic.-FA. La reducción de fondo proporcionada por el conjugado antic.-FA también resulta evidente a partir de una comparación entre las FIGS. 3B y 3D.

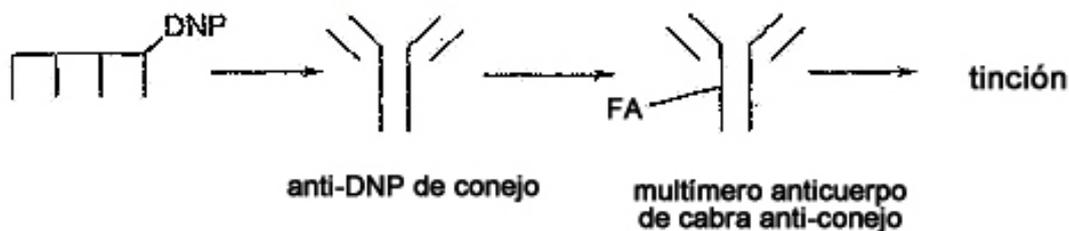
35 Ejemplo de referencia 9 - Detección del VPH en xenoinjertos de tejido

En el presente ejemplo se evaluó el rendimiento de un conjugado antic.-FA preparado utilizando MBH según el procedimiento del Ejemplo 4, en parte con el fin de determinar si proporcionaba suficiente sensibilidad para permitir una reducción adicional del número de etapas necesarias para detectar secuencias del VPH mediante ISH. Los resultados demuestran que resulta posible conseguir una reducción del número de etapas necesarias para la detección, de manera que el conjugado antic.-FA dado a conocer resulta muy útil para un procedimiento automatizado en el que una reducción del número de etapas conduce a una reducción significativa del tiempo de procesamiento y, concomitantemente, del coste del ensayo.

45 Los tres esquemas de detección presentados a continuación como Esquemas 12 a 14 se llevaron a cabo de manera automatizada o semi-automatizada. En cada uno de dichos esquemas en primer lugar se añadió a la muestra una sonda de ácidos nucleicos marcada con DNP que se une específicamente a por lo menos una parte de una secuencia de ácidos nucleicos del VPH. Las etapas posteriores ilustradas en estos esquemas son etapas utilizadas para detectar la presencia de la sonda unida al ácido nucleico del VPH.



Esquema 12



Esquema 13



Esquema 14

En el Esquema 12 en primer lugar se unió a la sonda un anticuerpo anti-DNP. A continuación se añadió un anticuerpo anti-IgG (primera etapa de amplificación). En la segunda etapa de amplificación se añadió un anticuerpo anti-IgG biotinilado. Se añadió un conjugado SA-FA, que se unió al anticuerpo biotinilado y se llevó a cabo la tinción mediante la adición de un sustrato cromogénico sobre el que actúa la FA. En el Esquema 13, se eliminó la segunda etapa de amplificación y se añadió un anticuerpo anti-IgG conjugado con FA antes de la tinción en lugar de un conjugado SA-FA. En el Esquema 14 se eliminaron ambas etapas de amplificación y la sonda marcada con DNP se detectó directamente con un anticuerpo anti-DNP conjugado con FA.

Se llevó a cabo la detección del VPH en una diversidad de líneas celulares cultivadas en xenoinjertos en ratones SCID siguiendo el procedimiento siguiente adaptado a partir de un protocolo ISH estándar para el instrumento de tinción automatizada BenchMark® (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Una muestra incluida en parafina sobre un portaobjetos se calentó a 75°C durante 4 minutos y después se trató dos veces con ajuste de volumen de EZPrep™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) a 75°C antes de la aplicación de LiquidCoverslip™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) con ajuste de volumen EZPrep™. Tras 4 minutos a 75°C, el portaobjetos se enjuagó y se añadió ajuste de volumen EZPrep™ para desparafinar el tejido a 76°C durante 4 minutos. Se dispensó un cubreobjetos líquido para cubrir la EZ-Prep™. Se añadió CellConditioner nº 2, solución de acondicionamiento celular (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se calentó el portaobjetos a 90°C y se incubó durante 8 minutos. A continuación se llevó a cabo otra aplicación de Cell Conditioner nº 2 y todavía otra incubación a 90°C durante 12 minutos. Se enjuagó el portaobjetos con tampón de reacción (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se enfrió a 37°C y se añadió ISH-proteasa 3 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras una incubación de 4 minutos, el portaobjetos se enjuagó tres veces antes de la aplicación de un tampón de hibridación (iView™ Plus HybReady™ Solution, 100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y se incubó durante 4 minutos. Tras la adición de una sonda de ácidos nucleicos del VPH marcada con DNP (sonda HR del VPH, 200 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se realizó una incubación de 4 minutos a 37°C, 12 minutos a 95°C y 124 minutos a 52°C. A continuación el portaobjetos se enjuagó dos veces y se calentó a 7°C. Esta última etapa se repitió dos veces más antes de enfriar el portaobjetos a 37°C y después, dependiendo del esquema de detección seguido, dichos portaobjetos se trataron de manera automatizada o semiautomatizada de tres maneras diferentes.

En un caso, tal como se ilustra en el Esquema 12, se aplicó iView™ + anticuerpo primario anti-DNP (100 µl, Ventana Medical Systems, inc., Tucson, AZ) y se incubó durante 20 minutos. A continuación, el portaobjetos se enjuagó dos veces antes de añadir iView™ + anticuerpo secundario de Amp (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). La incubación del conjugado se realizó durante 8 minutos antes de enjuagar el portaobjetos. Tras la adición de iVIEW™ + Biotina-Ig (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) se llevó a cabo una incubación de 12 minutos y la adición de iVIEW™ + SA-FA (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). El portaobjetos se enjuagó tres veces and de aplicar iView™ + intensificador (100 µl, VMSI), seguido de la incubación durante 4

minutos y la aplicación de iView™ + NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) e iView™ + BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). A continuación se incubó el portaobjetos durante un periodo de 24 minutos, se enjuagó tres veces y se añadió contratinción NFR (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras la incubación con la contratinción durante 4 minutos, el portaobjetos se enjuagó tres veces más y se extrajo del instrumento. El portaobjetos se trató con un lavado de detergente antes de la deshidratación con la serie etanol, acetona seguido de xileno. Se añadió un cubreobjetos al portaobjetos y después éste se observó y fotografió a través de un microscopio de campo brillante.

En otro caso, tal como se ilustra en el Esquema 13, se añadió un anticuerpo primario de conejo anti-DNP (anticuerpo primario anti-DNP iView™, 100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) . El anticuerpo primario se incubó durante 20 minutos y el portaobjetos seguidamente se enjuagó dos veces antes de la adición manual (esta etapa también puede automatizarse para que el procedimiento sea totalmente automático) del anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (100 µl). La incubación del conjugado se realizó durante 16 minutos antes de enjuagar el portaobjetos cuatro veces. Tras la aplicación del intensificador iView™ Plus (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) se llevó a cabo la incubación durante 4 minutos y se aplicó NBT y BCIP para el revelado del color (iView™ Plus NBT e iView™ Plus BCIP, 100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). A continuación se incubó el portaobjetos durante un periodo de 24 minutos, se enjuagó tres veces y se añadió contratinción NFR (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras la incubación con la contratinción durante 4 minutos, el portaobjetos se enjuagó tres veces más y se extrajo del instrumento. El portaobjetos se trató con un lavado de detergente antes de la deshidratación con la serie etanol, acetona y xileno. Tras la aplicación de un cubreobjetos, se observó el portaobjetos a través de un microscopio y se fotografió a 40X utilizando un microscopio de campo brillante.

En todavía otro caso, tal como se ilustra en el Esquema 14, el portaobjetos se trató directamente con un conjugado de anticuerpo de conejo anti-DNP-fosfatasa alcalina (100 µl). El portaobjetos se incubó durante 20 minutos y después se enjuagó dos veces antes de la aplicación de iView™ + intensificador (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras lo anterior, se incubó durante 4 minutos y se aplicó simultáneamente iView™ + NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) e iView™ + BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). A continuación se incubó el portaobjetos durante un periodo de 24 minutos, se enjuagó tres veces y se añadió contratinción NFR (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras la incubación con la contratinción durante 4 minutos, el portaobjetos se enjuagó tres veces más y se extrajo del instrumento. El portaobjetos se trató con un lavado de detergente antes de la deshidratación en serie con etanol, acetona y xileno. Se añadió un cubreobjetos al portaobjeto y se observó y fotografió a 40X mediante un microscopio de campo brillante.

Las FIGS. 5 a 7 muestran los resultados de la detección del VPH en tres tipos diferentes de tejido de xenoinjerto. En las FIGS. 5A, 5B y 5C, los patrones de tinción para la detección del VPH en tejido de xenoinjerto CaSki según cada uno de los Esquemas 12, 13 y 14, respectivamente. En las FIGS. 6A, 6B y 6C se muestran los patrones de tinción para la detección del VPH en tejido de xenoinjerto HeLa según cada uno de los Esquemas 12, 13 y 14, respectivamente. En las FIGS. 7A y 7B se muestran los patrones de tinción para la detección de VPH de copia única (indicada mediante flechas) en tejido de xenoinjerto SiHa según cada uno de los Esquemas 12 y 13, respectivamente.

Una comparación entre las FIGS. 5A y 5B demuestra que la intensidad de tinción proporcionada mediante la detección según el Esquema 13 es superior que la proporcionada según el Esquema 12, aunque el Esquema 13 incluye dos etapas menos de amplificación. La FIG. 5C demuestra que la detección del VPH puede llevarse a cabo sin la amplificación, utilizando la detección directa (Esquema 14) con un conjugado de antic.-FA preparado según el Ejemplo 4. Una comparación entre las FIGS. 6A y 6B también demuestra que la intensidad de tinción proporcionada por la detección según el Esquema 13 es mayor que la proporcionada según el Esquema 12, aunque el Esquema 13 incluye dos etapas de amplificación menos. La FIG. 6C demuestra que la detección del VPH puede llevarse a cabo sin amplificación utilizando la detección directa (Esquema 14) con un conjugado de antic.-FA preparado según el Ejemplo 4. Una comparación entre las FIGS. 7A y 7B muestra que incluso las copias únicas de secuencias de ácidos nucleicos del VPH pueden detectarse utilizando el procedimiento de detección del Esquema 13. Globalmente los resultados demuestran que la sensibilidad superior mostrada por el antic. específico para Fc-FA dado a conocer facilita la detección automatizada mediante la reducción del número de etapas necesarias para detectar el VPH en muestras de tejido. La reducción del número de etapas en los Esquemas 12 y 13 puede reducir el tiempo total del procedimiento automatizado de tinción en 15% (de 6,5 a 5,5 horas). Pueden conseguirse reducciones adicionales de tiempo de procedimiento mediante la utilización del Esquema 14.

Aunque en el presente ejemplo se describe una sonda marcada con DNP y tipos específicos de anticuerpos, el experto ordinario en la materia apreciará que pueden utilizarse muchos otros haptenos (tales como la fluoresceína, la digoxigenina y la biotina) para marcar secuencias de ácidos nucleicos y que la utilización de múltiples sondas de ácidos nucleicos para diferentes dianas, presentando cada una un marcaje de hapteno diferente, puede permitir la detección multiplexada (tal como diferentes anticuerpos de detección conjugados con diferentes nanopartículas

fluorescentes que emiten luz de diversas longitudes de onda diferentes). Además, el experto ordinario en la materia reconocerá que pueden utilizarse anticuerpos de otros tipos y de otras especies que las indicadas, con otros marcajes detectables y otros reactivos para generar una señal detectable, en ensayos similares para la detección de otras dianas.

5 Ejemplo de referencia 10 - Detección del VPH en preparaciones líquidas

10 Se prepararon portaobjetos para el ensayo prep. del VPH líquido utilizando el sistema de preparación de portaobjetos ThinPrep® 2000 (Cytoc Corporation, Marlborough, MA). Se introdujeron células obtenidas mediante raspado vaginal en una solución conservante tamponada basada en metanol (solución ThinPrep® PreservCyt, Cytoc Corporation, Marlborough, MA) y después se aplicó en capas sobre el portaobjetos de vidrio con el instrumento.

15 A continuación se proporciona un procedimiento adaptado del instrumento BenchMark® de Ventana: el portaobjetos prep. para líquidos se calentó a 65°C durante 12 minutos, seguido de 4 minutos adicionales a 75°C y se enjuagó dos veces con tampón de reacción (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ; 1,2 ml) a 75°C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). A continuación, el portaobjetos se enjuagó con 0,9 ml de tampón de enjuague (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), seguido de la aplicación de solución de acondicionamiento celular Cell Conditioner n° 2 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y el portaobjetos se calentó a 90°C y se incubó durante 16 minutos. Se enjuagó el portaobjetos con tampón de reacción, se enfrió a 37°C y se añadió ISH-proteasa 3 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras una incubación de 4 minutos, el portaobjetos se enjuagó tres veces antes de la aplicación de iView™ + HybReady (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), que se incubó durante 4 minutos. Tras la adición de una sonda HR del VPH (200 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se realizó una incubación de 4 minutos a 37°C, 12 minutos a 95°C y 124 minutos a 52°C. A continuación el portaobjetos se enjuagó dos veces y se calentó a 72°C. Esta última etapa se repitió dos veces más antes de enfriar el portaobjetos a 37°C y añadir iView™ + anti-DNP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ).

30 Para la detección estándar de SA-FA (según el Esquema 12, anteriormente), el anticuerpo primario se incubó durante 20 minutos y el portaobjetos seguidamente se enjuagó dos veces antes de añadir el anticuerpo secundario i™VIEW+ Amp (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, 100 µl). La incubación del anticuerpo se realizó durante 8 minutos antes del enjuague. A continuación, se añadió el conjugado i™VIEW + anticuerpo de IgG-biotina (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, 100 µl), seguido de una incubación de 12 minutos y una etapa de enjuague. Finalmente, se añadió el conjugado iVIEW™ + SA-FA (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, 100 µl) y tras una incubación de 8 minutos, el portaobjetos se enjuagó tres veces con tampón de reacción. Para la detección utilizando el conjugado de antic.-FA como anticuerpo secundario (según el Esquema 15, anteriormente), el anticuerpo primario se incubó durante 20 minutos y el portaobjetos seguidamente se enjuagó dos veces antes de añadir el conjugado de FA-IgG (100 µl). La incubación del conjugado se realizó durante 8 minutos antes de enjuagar tres veces con tampón de reacción. Para la detección directa de la sonda marcada utilizando el conjugado de antic.-FA, el conjugado se incubó durante 20 minutos antes de enjuagar el portaobjetos tres veces con tampón de reacción.

40 En los tres casos, tras las etapas anteriormente indicadas, la aplicación de iView+ intensificador (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) se llevó a cabo la incubación durante 4 minutos y se aplicó tanto iView™ + NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) como iView™ + BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). A continuación se incubó el portaobjetos durante un periodo de 24 minutos, se enjuagó tres veces y se añadió contratinción NFR (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Tras la incubación con la contratinción durante 4 minutos, el portaobjetos se enjuagó tres veces más y se extrajo del instrumento. El portaobjetos se trató con un lavado de detergente antes de la deshidratación con etanol, acetona y xileno y la posterior aplicación de un cubreobjetos en el portaobjetos, observando a continuación el portaobjetos a través de un microscopio.

55 Una comparación entre las FIGS. 8A y 8B demuestra que la detección según el Esquema 13 (ver el Ejemplo 9) utilizando un conjugado de antic.-FA preparado utilizando MBH según el procedimiento del Ejemplo 4 proporciona una tinción más intensa que la proporcionada mediante la detección utilizando un conjugado de SA-FA según el Esquema 14 (ver el Ejemplo 9). Una comparación entre las FIGS. 8B y 8C demuestra que la detección directa utilizando un conjugado de antic. anti-DNP-FA según el Esquema 14 (ver el Ejemplo 9) proporciona una señal que es comparable a la señal proporcionada por el conjugado de SA-FA según el Esquema 12. Estos resultados nuevamente demuestran que la sensibilidad de detección proporcionada por un conjugado de antic. específico para Fc-FA según el Ejemplo 4 permite una reducción del número de etapas necesarias para proporcionar señales adecuadas, facilitando de esta manera la automatización.

60 Ejemplo de referencia 11 - Detección de actina en tejido muscular

En el presente ejemplo, la detección inmunohistoquímica de una diana proteica (actina) utilizando un conjugado de antic.-FA preparado tal como se describe en el Ejemplo 4 con un conector MBH se comparó con el rendimiento de un conjugado de SA-FA.

5 A continuación se proporciona un procedimiento adaptado del instrumento BenchMark® de Ventana: el tejido recubierto con parafina sobre el portaobjetos se calentó a 75°C durante 4 minutos y después se trató dos veces con ajuste de volumen de EZPrep™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) a 75°C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) con ajuste de volumen EZPrep™. Tras 4 minutos adicionales a 76°C, el portaobjetos se enjuagó y se añadió ajuste de volumen Depar (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) conjuntamente con cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido. A continuación, el portaobjetos se enfrió a 42°C durante 2 minutos, antes de alcanzar la temperatura final de 37°C. Seguidamente se añadió el anticuerpo primario (100 µl, anticuerpo anti-actina muscular, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y el portaobjetos se incubó a 37°C durante 16 minutos. A continuación, el portaobjetos se enjuagó dos veces y se añadió el material de cabra antiratón conjugado con fosfatasa alcalina (100 µl) y se incubó a 37°C durante 16 minutos. El portaobjetos se enjuagó una vez antes de la adición simultánea de intensificador Enhanced V-Red (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) e intensificador naftol (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y el portaobjetos se incubó nuevamente a 37°C durante 4 minutos. A continuación, se añadió Enhance rojo rápido A (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y se incubó durante 8 minutos y se añadió Enhance rojo rápido B (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) con una incubación final de 8 minutos. Tras el revelado de la tinción, el portaobjetos se trató con un lavado de detergente antes de la deshidratación con etanol, acetona y xileno y la posterior aplicación de un cubreobjetos en el portaobjetos, observando a continuación el portaobjetos a través de un microscopio.

Los resultados se presentan en la FIG. 9. Concretamente, la FIG. 9A demuestra que la detección utilizando el conjugado de antic.-FA y una única etapa de amplificación es superior a la detección con un conjugado SA-FA y dos etapas de amplificación (FIG. 9B). Estos resultados demuestran nuevamente la superior sensibilidad de detección proporcionada por los conjugados de anticuerpo específico para Fc según la exposición.

Ejemplo 12 - Variación de la longitud y tipo de conectores de anticuerpo

En el presente ejemplo se determinó el efecto de la longitud y el tipo de conector sobre la composición del conjugado y las características de la tinción. Se prepararon varios conjugados según el método del Ejemplo 4, aunque utilizando una diversidad de conectores de hidrazida tiol, concretamente se prepararon conjugados utilizando un conector tio-PEG₄-hidrazida, un conector hidrazida de ácido mercaptobutírico (MBH) y un conector carbohidrazida de ácido mercaptobutírico (MBCH). Se compararon estos conjugados entre sí y con un conjugado preparado mediante la generación de tioles mediante reducción de disulfuros de inmunoglobulina, concretamente un conjugado antic.-FA preparado mediante el método descrito en la solicitud copendiente de patente provisional US nº 60/676759 que implica la generación de tioles mediante la reducción con DTT seguido de la conjugación utilizando un conector bifuncional maleimida-NHS basado en PEG. También a modo de comparación se utilizó una hidrazida de ácido acetamidomercaptobutírico (AMBH, Invitrogen, Eugene, OR) disponible comercialmente en el método del Ejemplo 4 para generar un conjugado antic.-FA. Además, se preparó un conjugado antic.-FA preparado con maleimido-hidrazida (EMCH; hidrazida de N[ácido ε-maleimidocaproico, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se utilizó en el protocolo de tinción para la comparación. Además, se utilizó el método de conjugación específica para Fc descrito en la patente US nº 5.191.066 utilizando cistamina para proporcionar un conjugado de antic. específico para Fc-FA para la comparación.

Los resultados del ensayo de Ellman demostraron que se habían añadido 3 a 5 tioles/antic. a una inmunoglobulina mediante la adición con los conectores de hidrazida tiol MBH y basado en PEG, 5 a 7 tioles/antic. con los conectores AMBH y MBCH y 8 a 12 tioles/antic. con el método de reducción con DTT. Tras el acoplamiento de los tioles introducidos o generados en la inmunoglobulina con FA derivatizada con maleimida, se obtuvieron los cromatogramas de exclusión por tamaño.

Los cromatogramas de exclusión por tamaño se obtuvieron utilizando un purificador AKTA (GE Biosciences, Uppsala, Suecia) utilizando una columna Superdex 10/300 200 GL y Tris 0,1 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, pH=7,5 como fase móvil. Se mantuvo el caudal a 1 ml/min. A partir de los cromatogramas de exclusión por tamaño se determinó que el mejor rendimiento de conjugado se obtenía utilizando AMBH. Sin embargo, empezó a precipitar al almacenarlo a una temperatura de entre 2°C y 8°C durante 48 horas. Todos los demás conectores rindieron conjugados que presentan perfiles de exclusión por tamaño similares.

La FIG. 10 compara la tinción descrita de manera general en el Ejemplo 6 de Kappa en tejido de amígdala utilizando los conjugados como anticuerpo secundario. La FIG. 10A muestra el patrón de tinción observado para un conjugado de antic.-FA preparado con EMCH. La FIG. 10B muestra el patrón de tinción observado para el método de cistamina específico para Fc de la patente US nº 5.191.066. La FIG. 10C muestra el patrón de tinción observado para el

conjugado de antic.-FA preparado mediante un método de reducción con DTT según la solicitud de patente US nº 11/413.418, presentada el 27 de abril de 2006, que utiliza un conector bifuncional basado en dPEG. La FIG. 10D muestra el patrón de tinción observado para el conjugado antic.-FA preparado con el conector AMBH disponible comercialmente utilizando el método dado a conocer de conjugación específica para Fc. La FIG. 10E muestra el patrón de tinción observado para el conjugado de antic.-FA preparado según el método de conjugación específica para Fc dado a conocer, utilizando el conector MBH dado a conocer del Ejemplo 1. La FIG. 10F muestra el patrón de tinción observado para el conjugado antic.-FA preparado según el método de conjugación específica para Fc dado a conocer, utilizando el conector hidrazida tiol dPEG4 dado a conocer del Ejemplo 3. La FIG. 10G muestra el patrón de tinción observado para el conjugado antic.-FA preparado según el método de conjugación específica para Fc dado a conocer, utilizando el conector hidrazida tiol MBCH dado a conocer del Ejemplo 2. Una comparación entre patrones de tinción revela la tendencia siguiente para la intensidad de tinción proporcionada por los conjugados:

EMCH < Cistamina < AMBH < MBCH < PEG4 = DTT < MBH

Las imágenes ilustran la superior sensibilidad que puede alcanzarse mediante la conjugación específica para Fc de enzimas utilizando el método dado a conocer y diversos conectores hidrazida tiol disponibles comercialmente. El método dado a conocer también rinde conjugados superiores al método de cistamina específico para Fc y el acoplamiento con EMCH. Únicamente el método mediado por DTT de conjugación proporciona conjugados que proporcionan especificidad y sensibilidad.

Ejemplo de referencia 13 - Variación de exceso de conector MBH

En el presente ejemplo se determinó la dependencia de la composición del conjugado y las características de tinción respecto al exceso de conector hidrazida tiol. La síntesis de conjugados de FA-IgG con conector MBH se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4; sin embargo, se modificó el exceso molar del conector MBH de un exceso de cinco mil veces a un exceso de cincuenta veces. Los resultados del ensayo de Ellman mostraron los números de tioles/antic. siguientes: 5000x -9-15; 1000x -7-10; 500x -3-5; 100x -2-4; 50x -1-3. El análisis de los conjugados (5000x, 1000x, 500x, 100x, y 50x) tras la reacción con antic. derivatizado con maleimida se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión por tamaño y demostró que los conjugados sintetizados utilizando un mayor exceso de conector presentaban un rendimiento global más elevado. Sin embargo, la tinción de tejidos (anti-músculo de ratón, actina muscular; anti-piel de conejo, S100) para cada uno de dichos conjugados demostró que 500x presentaba la tinción más intensa con el fondo mínimo.

Ejemplo de referencia 14 - Variación de longitud/tipo de conector de fosfatasa alcalina

En el presente ejemplo se determinó la dependencia de la composición del conjugado y las características de tinción respecto a la longitud y tipo de conector utilizado para añadir grupos reactivos con tiol a la fosfatasa alcalina. La síntesis de conjugados de FA-IgG con el conector MBH se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4, aunque se utilizaron los conectores siguientes para activar la fosfatasa alcalina para la reacción con el anticuerpo tiolado: LC-SMCC (Pierce, Rockford, IL), MAL-dPEG₈-éster de NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH), MAL-dPEG₄-éster de NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH) and MAL-dPEG₁₂-éster de NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH). Cada uno de dichos conectores se hizo reaccionar con FA en un exceso de cien veces, en un sistema de tampones (fosfato sódico 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, pH=7,5) durante 1 hora. Resultó necesario disolver el LC-SMCC en dimetilformamida (DMF) y añadirlo a la FA, aunque sin exceder el 10% del volumen total de DMF en el tampón. El ensayo de Ellman mostró una incorporación de maleimidas de 20/FA para los conectores PEG₁₂ y LC-SMCC, 27/FA para el conector PEG₈ y 30/FA para el conector PEG₄. Tras el acoplamiento con un anticuerpo tiolado-Fc (preparado con MBH), se obtuvieron cromatogramas de exclusión por tamaño tras la purificación. El conector PEG₁₂ proporcionó el rendimiento de conjugado más alto, seguido de los conectores PEG₈, LC-SMCC y PEG₄. La tinción de tejido (anti-músculo de ratón, actina muscular; anti-piel de conejo, S100) mostró un rendimiento de conjugado equivalente al del conjugado de PEG₁₂, proporcionando la tinción más intensa.

Ejemplo de referencia 15 - Variación de exceso de conector NHS-PEG₁₂-MAL

En el presente ejemplo se determinó la dependencia de la composición del conjugado y las características de tinción respecto al exceso de conector NHS-PEG₁₂-MAL utilizado para añadir grupos reactivos con tiol a la fosfatasa alcalina. Se llevaron a cabo síntesis de conjugados FA-IgG según el método del Ejemplo 4, en que se modificó el exceso molar de un conector MAL-dPEG₁₂-éster de NHS de un exceso de quinientas veces a un exceso de veinticinco veces.

Los resultados del ensayo de Ellman mostraron la incorporaciones de maleimida de: 500x -34 maleimidas; 250x -29 maleimidas; 100x -18-20 maleimidas; 50x -17 maleimidas; 25x -15 maleimidas. El análisis de los conjugados (500x, 250x, 100x, 50x y 25x) tras la reacción con el anticuerpo Fc tiolado, utilizando cromatografía de exclusión por tamaño, mostró que los conjugados sintetizados utilizando un mayor exceso de conector presentaban un rendimiento mayor y un porcentaje más alto de incorporación de maleimida. La tinción de tejido (anti-músculo de

ratón, actina muscular; anti-piel de conejo, S100) para cada uno de los conjugados demostró que la utilización de 100x maleimida proporcionaba la tinción más nítida y más intensa..

Ejemplo de referencia 16 - Variación de las proporciones molares de FA/Antic.

5 En el presente ejemplo se determinó la dependencia de la composición de conjugado y características de tinción con la proporción de anticuerpo tiolado (preparado con un conector MBH) y FA derivatizada con maleimida (conector NHS-PEG₁₂-MAL) en la reacción final. Se utilizaron las proporciones (anticuerpo/FA) siguientes: 2:1, 1:1, 1:2 y 1:3. Los perfiles de las cromatografías de exclusión por tamaño demostraron que el rendimiento máximo se obtuvo con una proporción molar de 2 FA:1 Antic. Sin embargo, la tinción de tejidos de los conjugados (anti-músculo de ratón, actina muscular; anti-piel de conejo, S100) demostró que la mejor proporción de señal a ruido se observaba con el conjugado 1:1.

Ejemplo 17 - Síntesis de FA entrecruzada

15 La fosfatasa alcalina es una proteína dimérica y su estabilidad puede incrementarse mediante entrecruzamiento del enzima para ayudar a impedir la disociación del dímero. Se entrecruzó la fosfatasa alcalina mediante el procedimiento siguiente. Se intercambió la fosfatasa alcalina (Biozyme, San Diego, CA; 17,5 mg, 0,125 mmoles) a un tampón diferente de aquel en que se había recibido (fosfato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,1 M, cloruro de magnesio 1,0 mM, cloruro de cinc 0,1 mM, pH=7,5) y se añadió a dextrano activado por aldehído, preoxidado y reconstituido (peso molecular medio: 40.000; Pierce Biotechnologies, Rockford, IL; 5 mg, 0,125 μ moles) en presencia de cianoborohidruro sódico (1,6 mg, 25 μ moles). A continuación se agitó mediante rotación la mezcla de reacción durante un periodo de una hora a temperatura ambiente. Se desactivó el exceso de aldehídos con etanolamina (151 μ l, 2,5 mmoles), seguido de la adición de más cianoborohidruro sódico (157,1 mg, 2,5 mmoles). La mezcla de reacción se agitó mediante rotación durante una hora adicional. Se aisló la FA entrecruzada mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un purificador Akta (GE Biosciences, Uppsala, Suecia) dotado de una columna Superdex 200 GL 10/300 (GE Biosciences, Uppsala, Suecia). El caudal era de 1 ml/min y la fase móvil acuosa era fosfato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,1 M, cloruro de magnesio 1,0 mM y cloruro de cinc 0,1 mM, a pH=7,5. Se cuantificó el número de aminas que quedan tras la reacción, utilizando un ensayo de fluoraldehído (Protein Assay Technical Handbook, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y de media quedaron 8 a 12 aminas tras el entrecruzamiento. La FA entrecruzada se unió a MAL-dPEG₁₂-éster de NHS (que reaccionó con las aminas restantes) y se conjugó con un anticuerpo Fc tiolado tal como se indica en el Ejemplo 4 para generar un conjugado que incluye un enzima FA entrecruzado. Los estudios de estabilidad han demostrado que el entrecruzamiento mejora la estabilidad del conjugado en un diluyente que contiene avidina (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ; P/N 95130). Concretamente, a 45°C, la pérdida total de intensidad de tinción el 3º día para el conjugado con la FA entrecruzada fue de 50%, mientras que en el mismo diluyente y a la temperatura, un conjugado preparado con una FA no entrecruzada perdió 50% de su intensidad de tinción el 1º día.

40 Se proporcionan métodos alternativos para entrecruzar FA a fin de incrementar su estabilidad en Bieniarz *et al.*, Bioconj. Chem. 9: 390-398, 1998; Bieniarz *et al.*, Bioconj. Chem. 9: 399-402, 1998, y la patente US nº 5.789.219. Estos métodos también pueden utilizarse para entrecruzar el enzima fosfatasa alcalina para la utilización en un conjugado dado a conocer.

Ejemplo 18 - SDS PAGE analítica de conjugados de fosfatasa alcalina

45 En el presente ejemplo se demostró la especificidad de Fc del método de conjugación del Ejemplo 4 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes. Se analizaron seis preparaciones diferentes del conjugado, 3 preparadas con un anticuerpo anti-IgG de ratón y 3 preparadas con un anticuerpo anti-IgG de conejo. Brevemente, se mezclaron cinco a 20 μ l de una solución de 100 a 200 ng por μ l de cada conjugado, con 4X tampón de carga de gel LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se añadió 2-mercaptoetanol hasta una concentración final de 1 mM. La mezcla de muestra se calentó moderadamente a una temperatura de entre 48°C y 50°C durante 5 minutos. Se seleccionó esta temperatura para minimizar la disociación del enlace covalente entre el enzima y el anticuerpo, permitiendo sin embargo la disociación de las cadenas ligera y pesada de la parte anticuerpo del conjugado por parte del 2-mercaptoetanol. A continuación, se enfrió cada muestra y se añadió a diferentes pocillos de un gel de poliacrilamida (un gel de poliacrilamida al 4-20%-Bis Tris NuPAGE™ o un gel de poliacrilamida al 3-8%-acetato de Tris NuPAGE™ de Invitrogen, Carlsbad, CA). Los estándares de peso molecular utilizados fueron los estándares Multimark™ y Mark 12 wide range™, los cuales se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). La electroforesis se llevó a cabo a 70 mA durante 60 a 90 minutos a temperatura ambiente utilizando un sistema de casetes Novex XCell II (Invitrogen, Carlsbad, CA). El tampón de migración era MES-SDS o tampón de acetato de Tris-SDS, para los geles al 3-8% y al 4-20%, respectivamente. Se retiraron los geles de los casetes y se lavaron dos veces en agua desionizada durante 5 minutos con el fin de eliminar el SDS y el tampón. A continuación, los geles de SDS-PAGE se fijaron en etanol/agua/ácido acético [40:50:10 (v:v:v)] durante 1 hora a temperatura ambiente y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 disuelto en metanol/agua/ácido acético [50:40:10 (v:v:v), Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO]. Los geles se tifieron durante un mínimo de 2 horas hasta un máximo de toda la noche, mediante balanceo suave a temperatura ambiente. El desteñido se llevó a cabo de la misma manera que la tinción. La solución de desteñido era idéntica a la solución de tinción menos el pigmento. Los geles se secaron utilizando un kit de secado de gel Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA). El análisis de los geles demostró claramente para cada uno de los conjugados la presencia de una banda a un peso molecular correspondiente a la cadena ligera del anticuerpo. Además, para cada conjugado, se observó una ausencia sustancial de bandas correspondientes al peso molecular de la cadena pesada y de la fosfatasa alcalina. Por el contrario, una serie de bandas en pesos moleculares más altos demostraron que la fosfatasa alcalina se unía selectivamente a la cadena pesada de las IgG de cada conjugado. Debido a que la cadena pesada de una inmunoglobulina incluye la región Fc, los resultados demostraron la naturaleza específica de sitio Fc de la conjugación.

Ejemplo 19 - Síntesis de un conjugado de anticuerpo-HRP específico de Fc

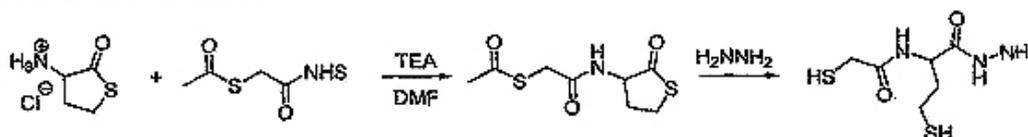
En el presente ejemplo se describe la preparación de un conjugado de anticuerpo específico para Fc que incluye un conector hidrazida tiol basado en PEG. Se añadieron grupos maleimida reactivos con tiol a la peroxidasa de rábano picante de la manera siguiente. A un vial ámbar de 4 ml se añadieron 7,8 mg (15,2 μ moles, 100 eq.) de MAL-dPEG₄TM-éster de NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH), seguido de peroxidasa de rábano picante (HRP, Pierce Biotechnology, Rockford, IL; 0,25 ml, 25 mg/ml en Na₃PO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH=7,5). Se hizo girar el vial en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora antes de la purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un purificador Akta dotado de una columna Superdex 200 (GE Biosciences, Uppsala, Suecia) utilizando una solución tampón acuosa (Na₃PO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH=7,5). Se agruparon las fracciones que contenían HRP, proporcionando una solución de HRP-PEG₄-maleimida. Se determinó la concentración de HRP a partir de la A₂₈₀ de la solución ($\epsilon_{280} = 0,652 \text{ ml cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) y se cuantificó que el número de maleimidias mediante un ensayo de Ellman modificado era de entre 6 y 8 maleimidias por cada enzima.

Se combinó la maleimido-peroxidasa de rábano picante purificada con un anticuerpo tiolado purificado (según el Ejemplo 4, preparado utilizando un conector MBH) en una proporción molar de 3:1 y se hizo girar durante un periodo de 18 h. La cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, Na₃PO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH=7,5) proporcionó el conjugado purificado, que se diluyó a A₂₈₀=0,0375 en diluyente de avidina con bloqueante B5 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) y se analizó en tejido. Una comparación entre la tinción del antígeno específico de próstata en el tejido de próstata utilizando el conjugado de HRP del presente Ejemplo y un conjugado de HRP preparado mediante reducción con DTT de la inmunoglobulina indicada en la solicitud de patente provisional US n° 60/675.759 demostró que el conjugado de HRP del presente Ejemplo mostraba ligeramente menos fondo que el conjugado de HRP preparado con DTT, aunque también mostró una intensidad de tinción ligeramente inferior.

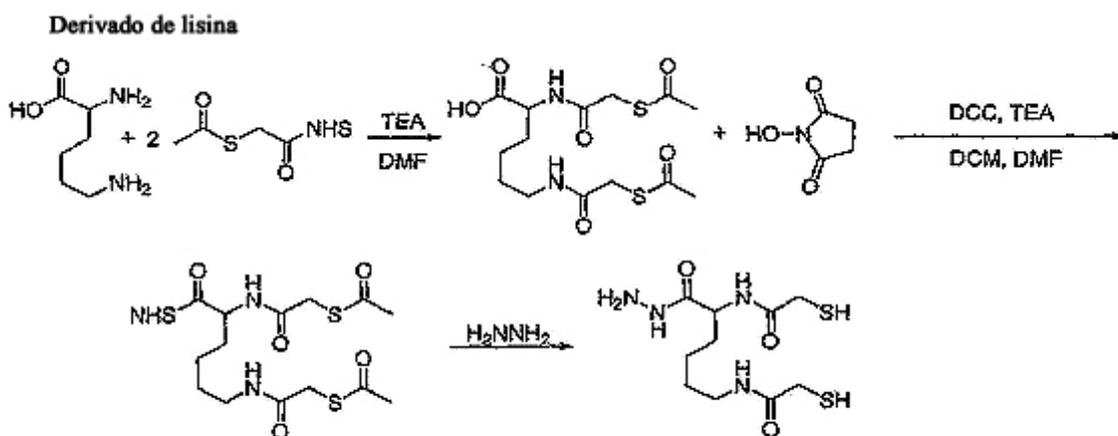
Ejemplo de referencia 20 - Conectores hidrazida tiol multifuncionales derivados de aminoácidos

Los conectores hidrazida tiol multifuncionales que pueden utilizarse en el método dado a conocer pero que no forman parte de la invención se preparan a partir de aminoácidos y análogos de aminoácidos según los Esquemas 2a, 2b, 2c y 2d, anteriormente. En el presente ejemplo, se describen de manera general en los esquemas siguientes rutas sintéticas a conectores específicos. En cada uno de los esquemas específicos 15a, 15b, 15c y 15d, en primer lugar se hace reaccionar un aminoácido o análogo de aminoácido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con S-acetiltilioacetato de N-succinimidilo (SATA, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) en presencia de trietilamina (TEA). En el Esquema 15a, el producto de dicha primera reacción se hizo reaccionar con hidrazina, proporcionando un conector hidrazida tiol multifuncional que presentaba un grupo hidrazida y dos grupos tiol. En el Esquema 15b, se utilizó el acoplamiento con DCC mediado por carbodiimida para formar un éster activo de NHS con la funcionalidad ácido carboxílico del producto de la primera reacción, seguido de la reacción con hidrazina, rindiendo otro conector hidrazida tiol multifuncional que presenta un grupo hidrazida y dos grupos tiol. En el Esquema 15c, tal como en 15b, tras la formación de éster de NHS utilizando el producto de dicha primera reacción se hizo reaccionar con hidrazina, rindiendo un conector hidrazida tiol multifuncional que presentaba dos grupos hidrazida y un grupo tiol. En el Esquema 15d, la reacción con hidrazina rinde un conector hidrazida tiol multifuncional que presenta un grupo hidrazida, un grupo tiol y un grupo hidroxilo.

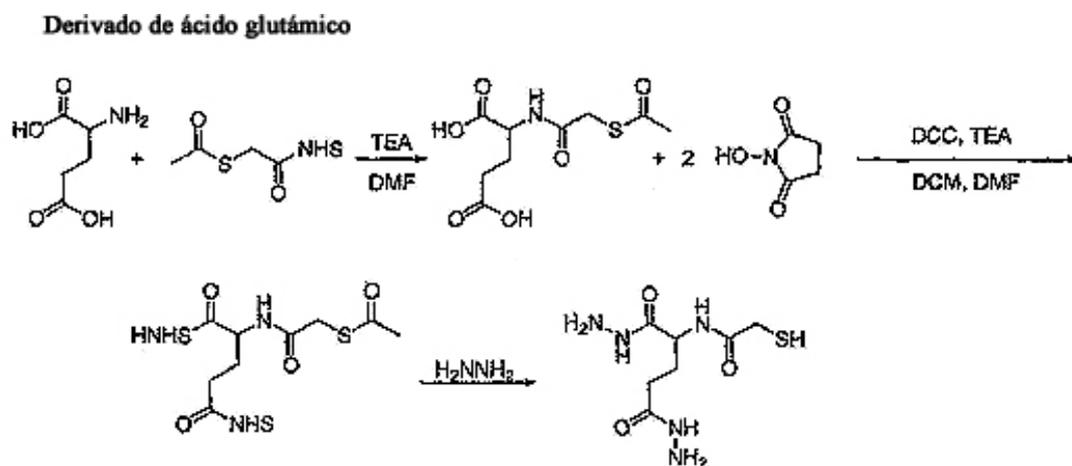
Derivado de homocisteína



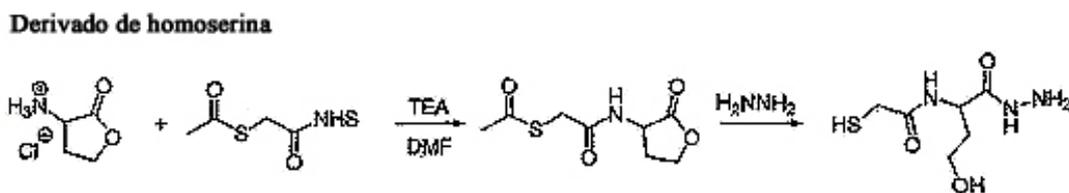
Esquema 15a



Esquema 15b



Esquema 15c



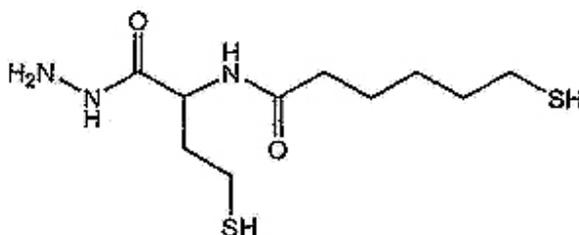
Esquema 15d

5 Los productos de los Esquemas 15a, 15b, 15c y 15d eran, respectivamente, hidrazida de ácido 2-mercaptoacetamido-mercaptobutírico (MAMBH), N,N'-(6-hidrazinil-6-oxohexán-1,5-diil)bis(2-mercaptoacetamida) (BTAL), N-(1,5-dihidrazinil-1,5-dioxopentán-2-il)-2-mercaptoacetamida (TAGD) y N-(1-hidrazinil-4-hidroxi-1-oxobután-2-il)-2-mercaptoacetamida.

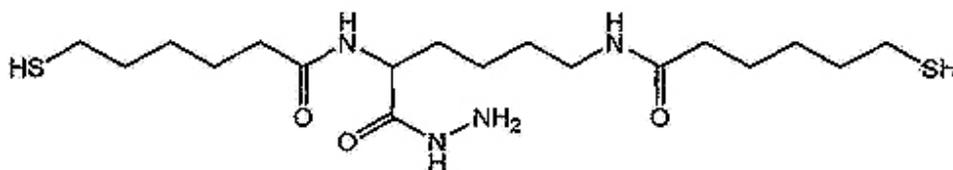
10 En una realización particular, se sintetizó MAMBH de la manera siguiente. En primer lugar, se preparó S-acetiltioacetamida homocisteína mediante la preparación de una solución de trietilamina (0,15 ml, 1,1 mmoles) en acetonitrilo (10 ml), a la que se añadió hidrocloreto de homocisteína (150 mg, 1,0 mmol). La suspensión resultante se agitó durante 5 minutos antes de añadir tioacetato de S-acetilo (250 mg, 1,1 mmoles). La reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente y después se concentró al vacío. La cromatografía de columna (SiO₂, CH₂Cl₂/

Et₂O 9:1) resultó en el aislamiento del producto en forma de polvos incoloros. Rendimiento: 174 mg (75%): RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 6,66 (bs, 1 H), 4,51-4,41 (p, *J*= 6,7 Hz, 1 H), 3,63-3,50 (m, 2 H), 3,36-3,18 (m, 2 H), 2,88-2,80 (m, 1 H), 2,38 (s, 3 H), 2,01-1,88 (m, 1 H); RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃) δ 204,37, 195,38, 168,59, 59,51, 32,74, 31,43, 30,18, 27,43; EMAR-IEP *m/z* 256,00693 (M + Na⁺, C₈H₁₁NNaO₃S₂ calc.: 256,00780). A continuación, se preparó hidrazida de ácido 2-mercaptoacetamido-mercaptobutírico (MAMBH) mediante la adición de la S-acetiltioacetamida homocisteína (300 mg, 1,3 mmoles) a monohidrato de hidrazina (10 ml). La suspensión resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, momento en el que la solución se tornó homogénea. Se eliminó la hidrazina al vacío y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa (15% C₈SiO₂, H₂O/MeOH/AcOH 160:39:1), proporcionando el compuesto deseado en forma de un aceite incoloro. Rendimiento: 207 mg (72%): RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD) δ 4,52-4,46 (m, 1 H), 3,23-3,21 (m, 2 H), 2,59-2,52 (m, 2 H), 2,10-2,01 (m, 2 H); RMN ¹³C (62,9 MHz, CD₃OD) δ 172,82, 172,43, 52,49, 37,72, 21,42, 20,49; EMAR-IEP *m/z* 246,03251 (M + Na⁺, C₆H₁₃N₃NaO₂S₂ calc.: 246,03469).

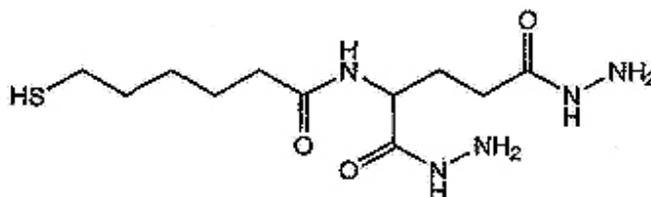
La sustitución del éster de NHS del ácido 6-acetiltiohexanoico por SATA en los Esquemas 15a, 15b y 15c rindió los compuestos correspondientes TMBH, BTHL y THGD que se muestran posteriormente. El éster de NHS de ácido 6-acetiltiohexanoico presenta la estructura mostrada a continuación. El éster de NHS de ácido 6-acetiltiohexanoico puede prepararse mediante acoplamiento mediado por carbodiimida de ácido 6-acetiltiohexanoico y N-hidroxisuccinimida.



Hidrazida de ácido tiohexanamidomercaptobutírico (THMBH)

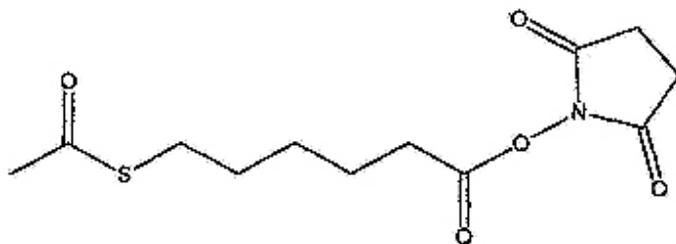


Bistiohexanamidohidrazidolisina (BTHL)



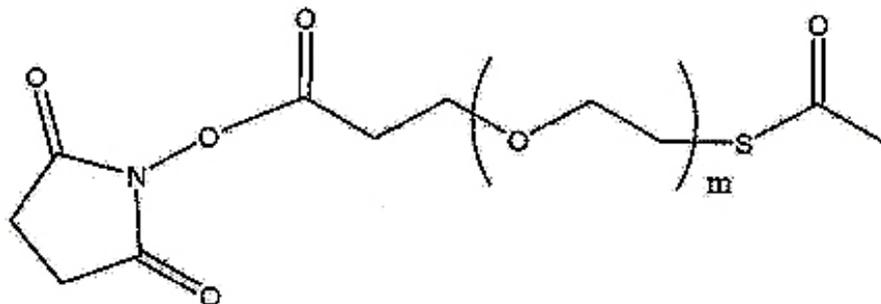
Dihidrazida de ácido tiohexamidoglutámico (THGD)

éster de NHS de ácido 6-acetiltiohexanoico presenta la estructura siguiente:



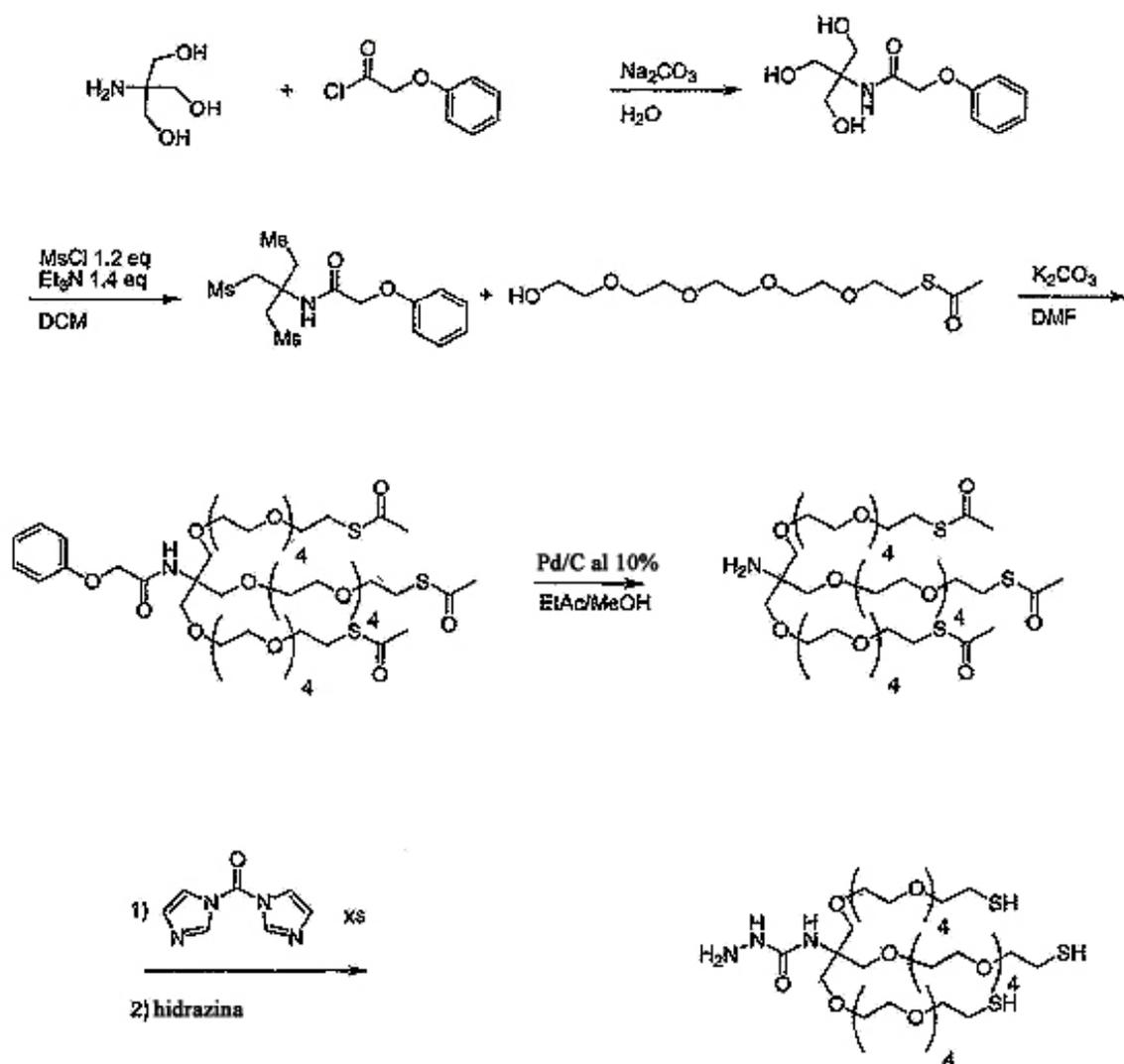
y se prepara mediante acoplamiento mediado por carbodiimida de ácido 6-acetiltiohexanoico con N-hidroxisuccinimida (ambos disponibles de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

- 5 El experto ordinario en la materia también reconocerá que los derivados de ácido S-acetil-tiocarboxílico basados en PEG pueden sustituirse por SATA en los esquemas anteriores, proporcionando conectores basados en PEG multifuncionales que pueden utilizarse en el método dado a conocer de conjugación pero que no forman parte de la invención. Por ejemplo, los conectores hidrazida tiol multifuncionales basados en PEG pueden prepararse mediante sustitución de una molécula de la fórmula a continuación por SATA en los Esquemas 15a-d, anteriormente: en los que $m=2$ a 50. Los compuestos de dicha fórmula se encuentran disponibles comercialmente de Quanta Biodesign
- 10 (Powell, OH) o pueden prepararse a partir de los ácidos carboxílicos correspondientes.



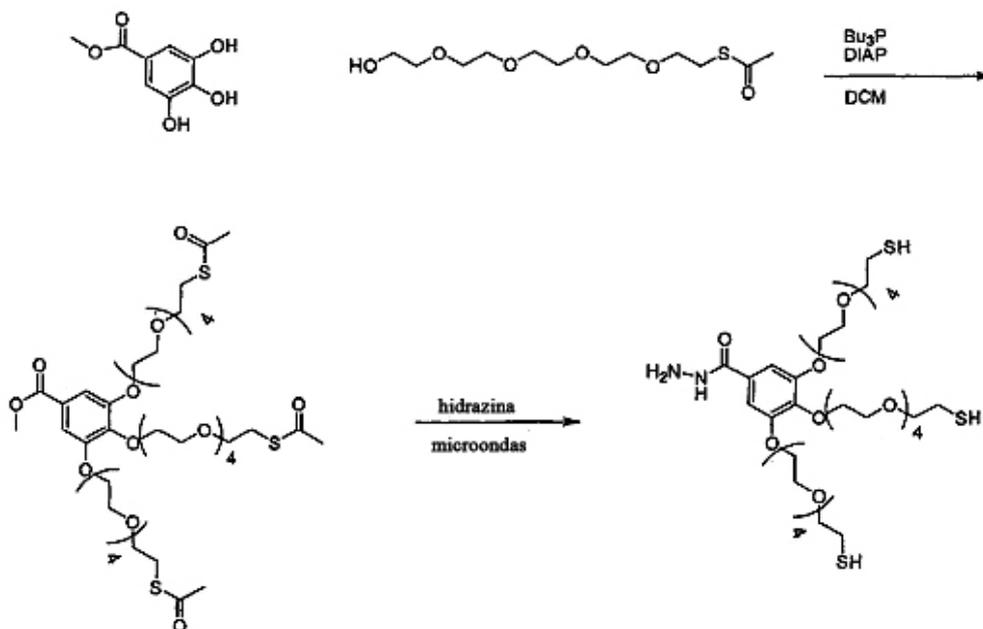
Ejemplo de referencia 21 - conectores hidrazida tiol basados en PEG multifuncionales

- 15 Los conectores hidrazida tiol basados en PEG multifuncionales que pueden utilizarse en el método dado a conocer pero que no forman parte de la invención se preparan según los Esquemas 3a, 3b y 3c, anteriormente. En el presente ejemplo, se describen de manera general rutas sintéticas a conectores específicos en los Esquemas 16a, 16b y 16c, a continuación. También se presentan protocolos específicos para las reacciones. A menos que se indique lo contrario, los reactivos y solventes son convencionales y pueden obtenerse, por ejemplo, de Sigma-
- 20 Aldrich (St. Louis, MO).

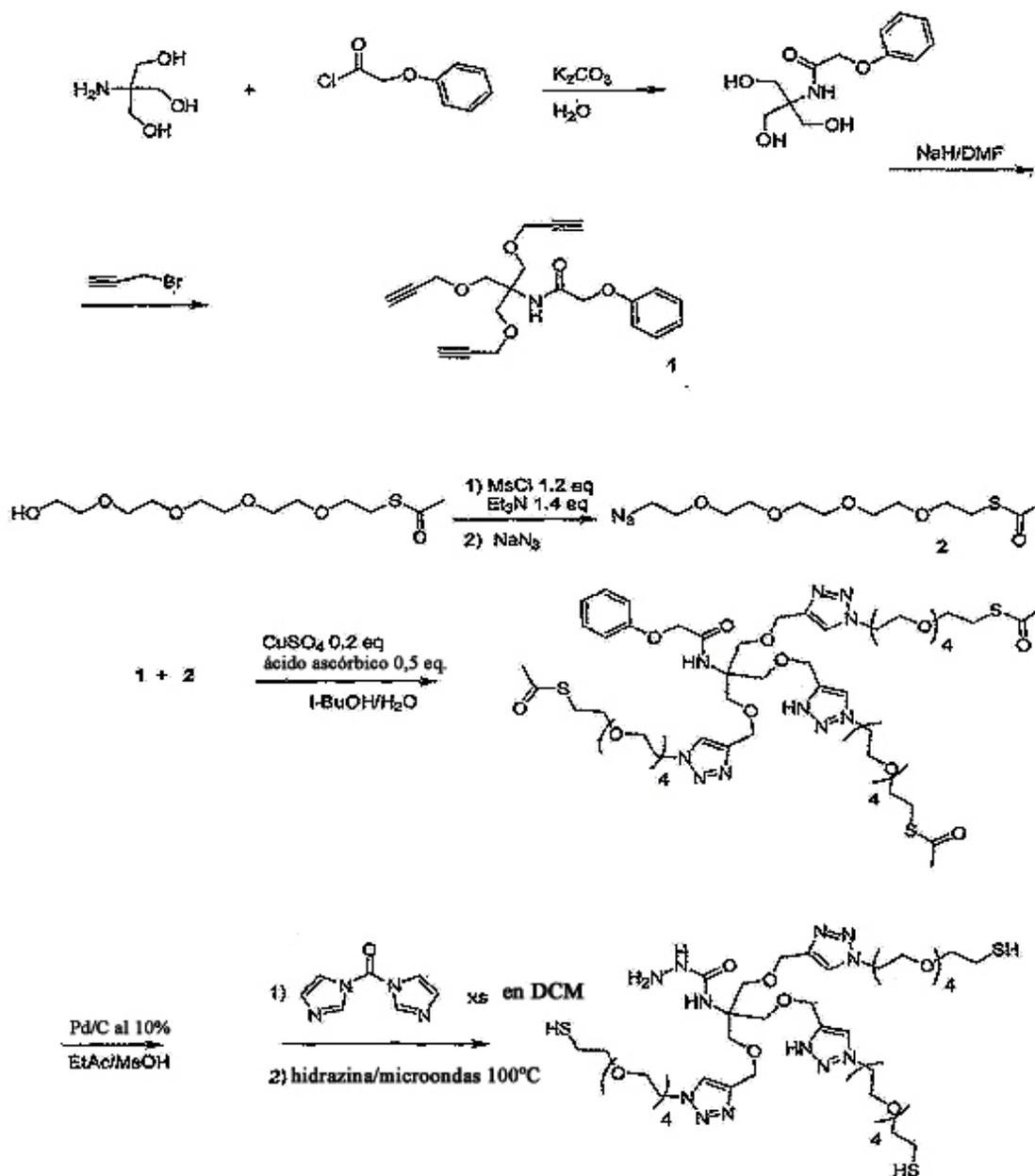


Esquema 16a

- Según el Esquema 16a, a una solución de 5,0 gramos de Tris en 10 ml de agua se añadió carbonato sódico (1,3 eq.) seguido de acetilcloruro de fenoxi (1,2 eq.) y se dejó bajo agitación la reacción sobre hielo y bajo nitrógeno durante 16 horas. El producto amino-prottegido que precipitó seguidamente se lavó tres veces con agua y se secó al vacío. El
- 5 compuesto puro resultante de dicha primera reacción se obtuvo mediante cromatografía en una columna C18 basada en sílice, eluyendo con acetonitrilo/ H_2O , acetonitrilo al 5-100% durante 30 minutos. A continuación se introdujeron grupos mesilato mediante tratamiento con trietilamina (4,0 eq.) y cloruro de metanosulfonilo (5,0 eq.) en DMF. Se eliminó el DMF bajo vacío, se introdujo el residuo en DCM seco y se separaron las sales mediante filtración. La eliminación del DCM bajo vacío proporcionó el mesilato en bruto 2, que se utilizó sin purificación
- 10 adicional. A una solución del mesilato (0,3 eq.) en DMF seco se añadió $\text{HO-dPEG}_4\text{-SATA}$ (1,0 eq., Quanta Bidesign, Powell, OH) y K_2CO_3 (1,5 eq.) y la reacción se dejó bajo agitación bajo nitrógeno durante 16 horas. Se eliminó el DMF bajo vacío, se introdujo el residuo en DCM seco y se separaron las sales mediante filtración. La eliminación del DCM bajo vacío seguido de cromatografía en gel de sílice proporcionó el intermediario pegilado. El grupo protector Pac seguidamente se eliminó mediante tratamiento con Pd/C en una mezcla de EtAc/MeOH. A
- 15 continuación se elaboró la semicarbizida, mediante tratamiento del intermediario resultante, en primer lugar con carbonil-diimidazol (10 eq.), seguido de hidrazina (100 eq.).

**Esquema 16b**

5 Según el Esquema 16b, a una solución de alcohol (HO-PEG₄-SATA, Quanta Biodesign, Powell, OH, 1,3 eq.) en DCM se añadieron 1,5 eq. de diazo-diisopropildicarboxilato, seguido de 1,8 eq. de tributil-fosfina y la reacción se agitó bajo nitrógeno seco durante 30 minutos. A continuación, a la suspensión resultante se añadió 1,0 eq. del fenil en DCM y se dejó la reacción bajo agitación bajo nitrógeno seco durante 16 h. El éter de fenol obtenido tras la cromatografía en gel de sílice seguidamente se introdujo en hidrazina sin diluir y la solución se sometió a microondas, proporcionando el conector hidrazida tiol basado en PEG multifuncional.



Esquema 16c

- Según el Esquema 16c, a una solución de 5,0 gramos de Tris en 10 ml de agua se añadió carbonato de potasio (1,3 eq.) seguido de acetilcloruro de fenoxi (1,2 eq.) y se dejó bajo agitación la reacción sobre hielo y bajo nitrógeno durante 16 horas. El producto amino-protegido que precipitó seguidamente se lavó tres veces con agua y se secó al vacío. A continuación se introdujeron los grupos alquino mediante tratamiento con hidruro sódico (3,0 eq.) y bromuro de propargilo (10 eq.) en DMF, proporcionando el intermediario alquino 1 tras la cromatografía en gel de sílice. A una solución de HO-PEG4-SATA (Quanta Biodesign, Powell, OH) en DCM se añadió cloruro de metanosulfonilo (1,2 eq.) seguido de trietilamina (1,4 eq.) y se dejó la reacción bajo agitación sobre hielo y bajo nitrógeno durante 16 horas. Seguidamente se separó la sal trietilamina mediante filtración y se secó el producto mesilato al vacío. A una solución del alcohol mesilado en DCM se añadió azida sódica (1,2 eq.) y se dejó la reacción bajo agitación bajo nitrógeno durante 16 horas, proporcionando el intermediario azida 2 tras la cromatografía en gel de sílice. A una solución 1:1 de t-butanol/agua que contenía sulfato de cobre (0,2 eq.) y ascorbato sódico (0,5 eq.) se añadió un equivalente de cada uno de los intermediarios alquino 1 y azida 2. A continuación se agitó la reacción bajo nitrógeno durante dieciséis horas, proporcionando el intermediario con el nitrógeno protegido tras la cromatografía en gel de sílice. A continuación se eliminó el grupo protector de nitrógeno mediante tratamiento con Pd/C al 10% en una mezcla 1:1 de acetato de etilo y metanol y seguidamente se obtuvo la amina libre mediante un tratamiento ácido-base. A una

solución de la amina libre en DCM se añadió carbonil-diimidazol (10 eq.) y la reacción se agitó bajo nitrógeno durante cuatro horas. A continuación la reacción se concentró bajo vacío y el residuo se introdujo en hidrazina sin diluir. A continuación la solución se sometió a microondas a 100°C durante 1 hora, proporcionando el conector hidrazida tiol basado en PEG multifuncional.

5 Resultará evidente para el experto en la materia que las moléculas basadas en PEG pueden sustituirse por otros alcoholes SATA en dichos esquemas, proporcionando conectores hidrazida tiol basados en PEG multifuncionales adicionales y que también pueden sustituirse por alcoholes PEG SATA de diferentes longitudes.

10 Ejemplo de referencia 22 - Síntesis de conector hidrazida tiol de poli(acrilamida)

En el presente ejemplo, se proporciona un conector hidrazida tiol multivalente polimérico, que puede prepararse según el Esquema 17, a continuación.



Esquema 17

15 En el Esquema 19, x puede ser, por ejemplo, 100 a 500 e y puede ser, por ejemplo, 10 a 50. L representa un reactivo tiolante utilizado para convertir una parte de los grupos hidrazida en grupos tiol. La hidrazida de poli(acrilamida) (PAH) puede sintetizarse mediante el método proporcionado en la solicitud de patente US publicada n° 2005/0158770. Brevemente, en un matraz de fondo redondo de 100 ml con un condensador, se mezclaron 20 ml de poli(acrilamida) (1 mmol, al 50% en peso en agua, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wis.) con 10 ml de agua destilada (DI) y 20 ml de monohidrato de hidrazina (420 mmoles, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wis.). La reacción se sometió a microondas durante e60 min. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se precipitó la reacción con un volumen igual de metanol, se centrifugó y se decantó. Se introdujo el residuo en 50 ml de agua DI y se repitió la precipitación un total de tres veces. El residuo final se disolvió en agua DI y se liofilizó, proporcionando unos polvos higroscópicos blancos finos. En un solvente apropiado, la PAH resultante se hizo reaccionar con un agente tiolante, tal como tiol-dPEG-éster de NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH) o reactivo de Traut, tiolando una parte (por ejemplo aproximadamente 50 a 75%) de las hidrazidas disponibles (z=5 a 40) y proporcionando un conector hidrazida tiol multifuncional polimérico que puede utilizarse en el método dado a conocer. Pueden encontrarse reactivos tiolantes adicionales en, por ejemplo, Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8.

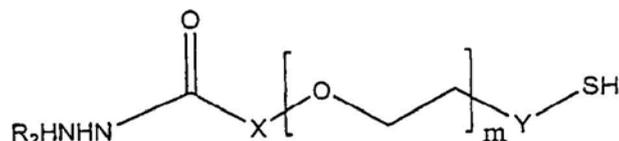
30 Resulta posible utilizar/preparar el conector hidrazida de poli(acrilamida) tiol de dos maneras diferentes, sintetizándolo en primer lugar y utilizando el método de conjugación dado a conocer, o en primer lugar haciendo reaccionar PAH con una molécula, tiolando PAH y después haciendo reaccionar la primera molécula ahora tiolada con una segunda molécula. Aunque la descripción detallada se ha encontrado en los conjugados de anticuerpo-enzima, los conectores y métodos pueden utilizarse para preparar cualquier tipo de conjugado, incluyendo conjugados de anticuerpos y otros marcajes detectables, tales como nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas metálicas y semiconductoras, tales como nanopartículas de oro y puntos cuánticos, respectivamente), moléculas fluorescentes, moléculas fluorogénicas, moléculas coloreadas, moléculas colorigénicas y constructos paramagnéticos (tales como quelatos de iones paramagnéticos). También se encuentran contemplados conjugados de anticuerpos para terapias dirigidas (por ejemplo conjugados de anticuerpos con moléculas farmacológicas, toxinas y constructos radioactivos, tales como quelatos de iones metálicos radioactivos). Además, deben entenderse que, aunque puede utilizarse uno o más de un solo conector hidrazida tiol para formar un conjugado, también resulta posible utilizar múltiples conectores hidrazida tiol diferentes para formar un conjugado. Los conjugados dados a conocer pueden utilizarse en cualquier tipo de ensayo en el que pueda utilizarse una molécula de unión específica unida a un marcaje detectable, en cualquier tipo de inmunoensayo además de los ensayos inmunohistoquímicos ilustrados, o en cualquier tipo de ensayo de hibridación *in situ*. Pueden llevarse a cabo los protocolos de detección manualmente o de manera automatizada. Además, los conectores dados a conocer también pueden utilizarse para modificar superficies para la unión de moléculas a un sustrato, y dichas reacciones de modificación superficial pueden llevarse a cabo utilizando el método dado a conocer.

50

REIVINDICACIONES

1. Método para formar un conjugado de dos o más moléculas, que comprende:
hacer reaccionar un conector hidrazida tiol, en el que el compuesto conector hidrazida tiol presenta la fórmula:

5



en la que $m=2$ a 50,

10

R_2 es H, $-\text{CONHNH}_2$ o $-\text{CO-A-CONHNH}_2$, en el que A es un grupo divalente que presenta entre 1 y 100 átomos de carbono y X e Y son, independientemente, un enlace o un grupo divalente que presenta 1 a 20 carbonos, presentando una primera molécula un grupo reactivo con hidrazida para formar una primera molécula tiolada, en el que el conector hidrazida tiol con la primera molécula comprende hacer reaccionar bajo condiciones en las que un grupo tiol del conector hidrazida tiol se encuentra sustancialmente presente en su forma de ácido neutro, y hacer reaccionar la primera molécula tiolada con una segunda molécula, presentando la segunda molécula un grupo reactivo con tiol, para formar el conjugado, en el que el grupo reactivo con hidrazida de la primera molécula comprende un grupo aldehído, y en el que la primera molécula comprende una molécula glucosilada y el grupo aldehído se introduce en la primera molécula mediante oxidación de una parte glucosilada de la primera molécula.

15

2. Método según la reivindicación 1, en el que la primera molécula comprende una molécula de unión específica y la segunda molécula comprende un marcaje detectable.

20

3. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción bajo condiciones en las que el grupo tiol del compuesto conector hidrazida tiol se encuentra sustancialmente presente en su forma de ácido neutro comprende la reacción a un pH inferior a aproximadamente 7.

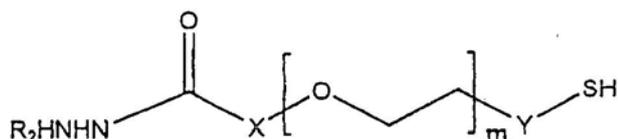
25

4. Método según la reivindicación 1, en el que la molécula glucosilada comprende un anticuerpo y el grupo aldehído se introduce en una parte Fc del anticuerpo.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el grupo reactivo con tiol de la segunda molécula comprende un grupo maleimida introducida en la segunda molécula.

30

6. Conjugado que comprende un anticuerpo unido covalentemente a un marcaje detectable mediante un conector hidrazida tiol, en el que el conector hidrazida tiol presenta la fórmula:



35

en la que $m=2$ a 50, R_2 es H, $-\text{CONHNH}_2$ o $-\text{CO-A-CONHNH}_2$, en el que A es un grupo divalente que presenta entre 1 y 100 átomos de carbono, y X e Y son, independientemente, un enlace o un grupo divalente que presenta entre 1 y 20 carbonos, y en el que un grupo hidrazida del conector se une covalentemente a una región Fc del anticuerpo.

7. Conjugado según la reivindicación 6, en el que el marcaje detectable comprende un enzima, una molécula fluorescente, un hapteno o una nanopartícula fluorescente.

40

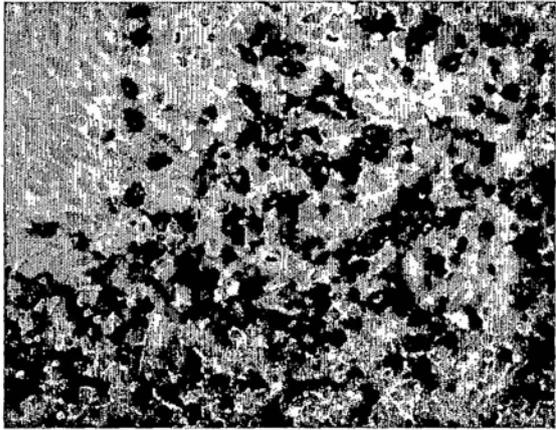


FIG. 1A

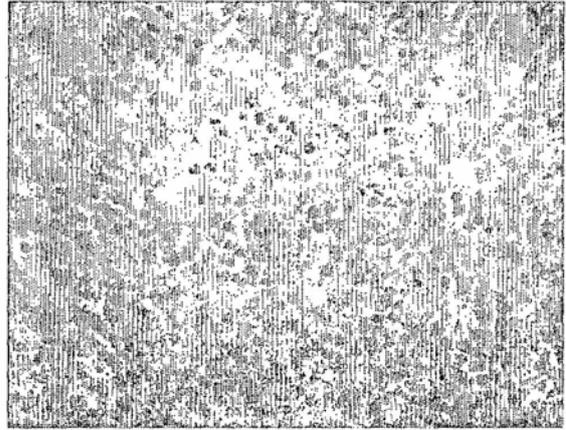


FIG. 1B

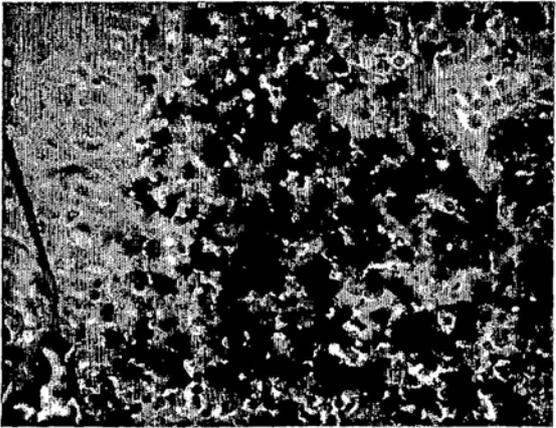


FIG. 1C

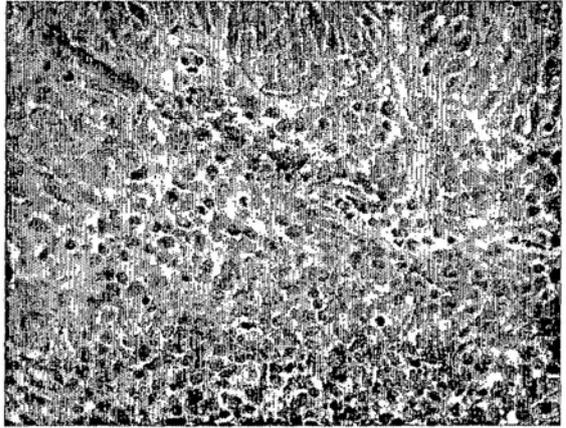


FIG. 1D

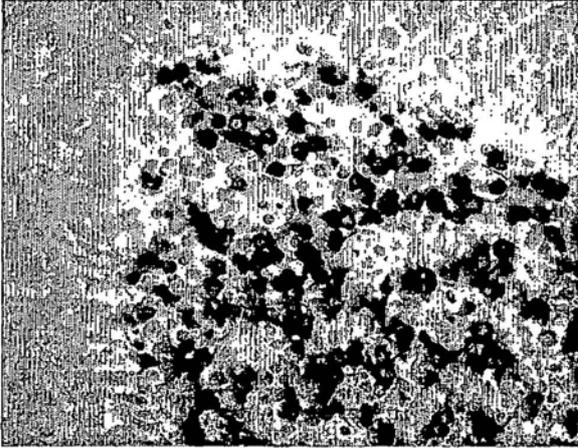


FIG. 2A

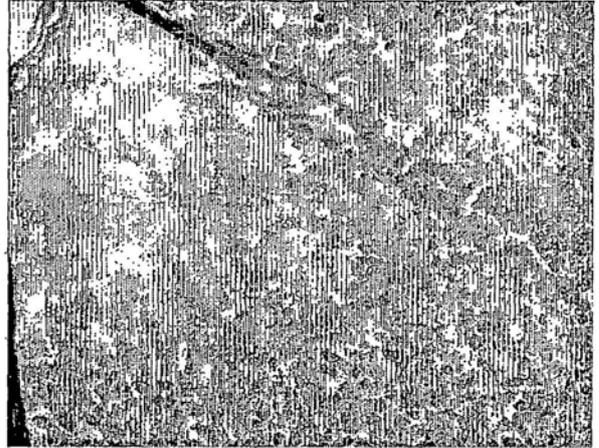


FIG. 2B

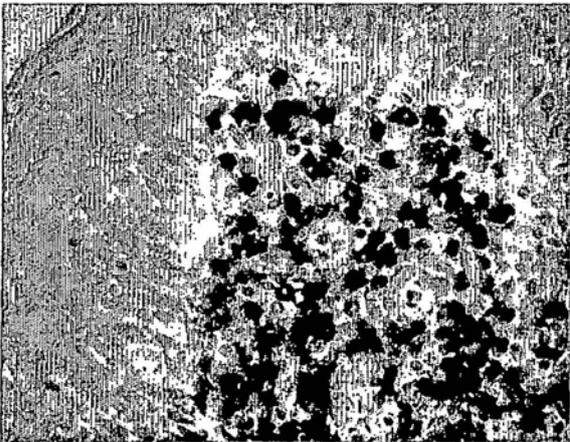


FIG. 2C

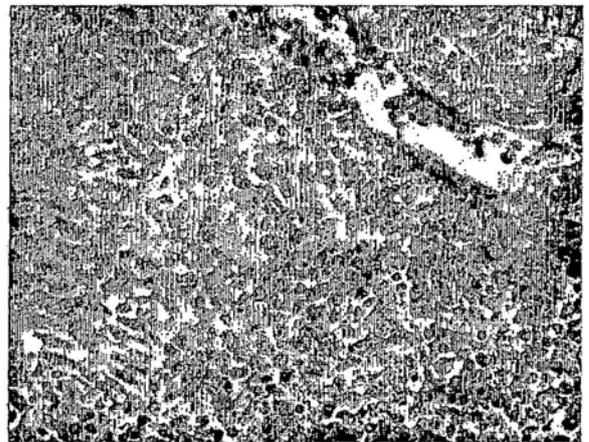


FIG. 2D

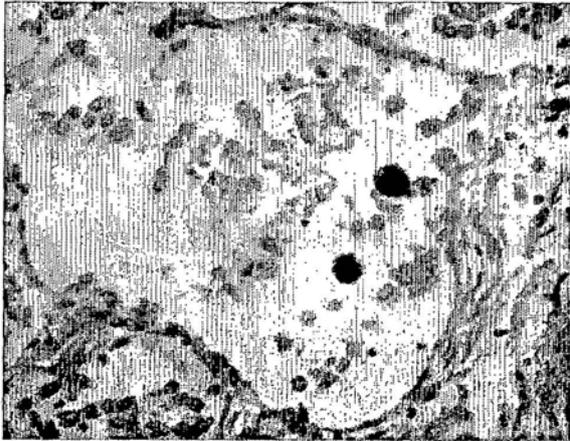


FIG. 3A



FIG. 3B

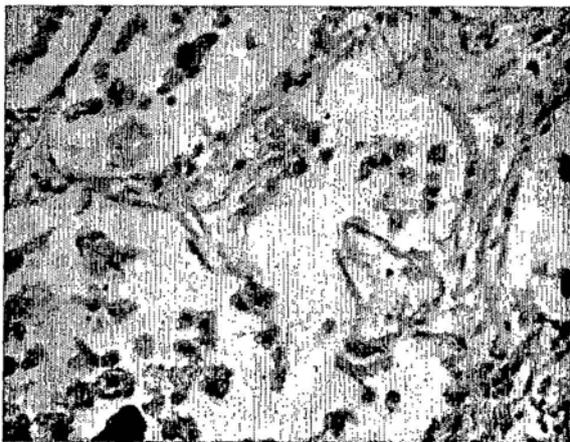


FIG. 3C

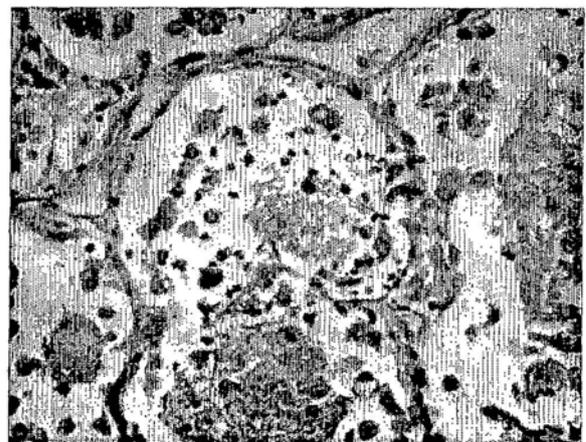


FIG. 3D

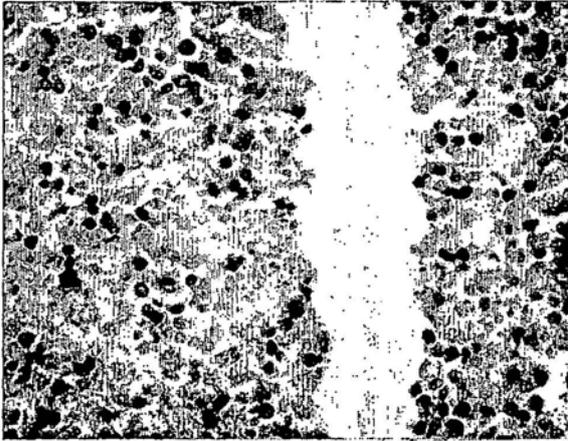


FIG. 4A

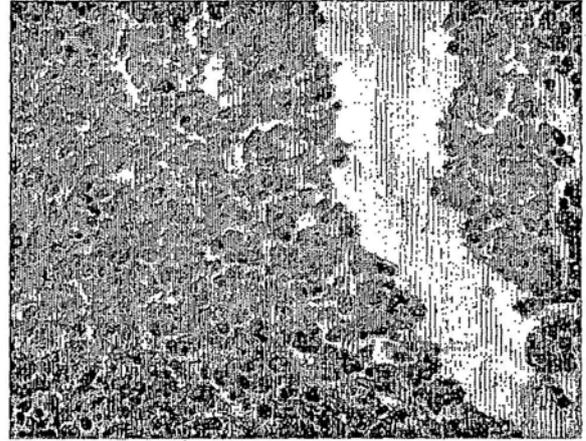


FIG. 4B

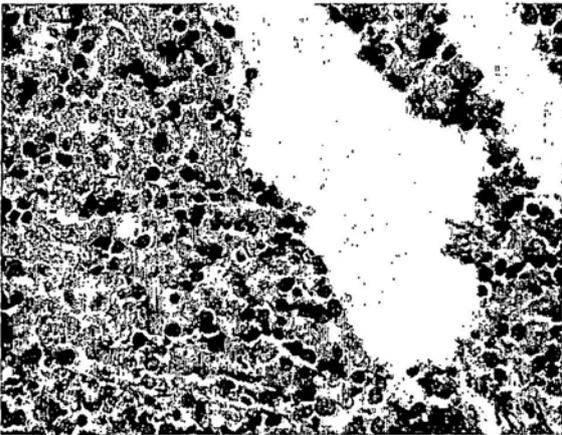


FIG. 4C

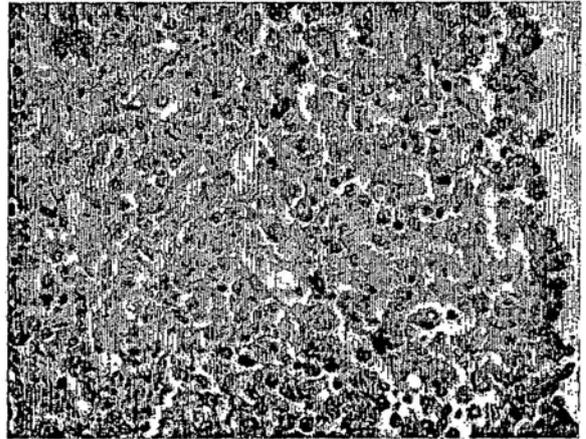


FIG. 4D

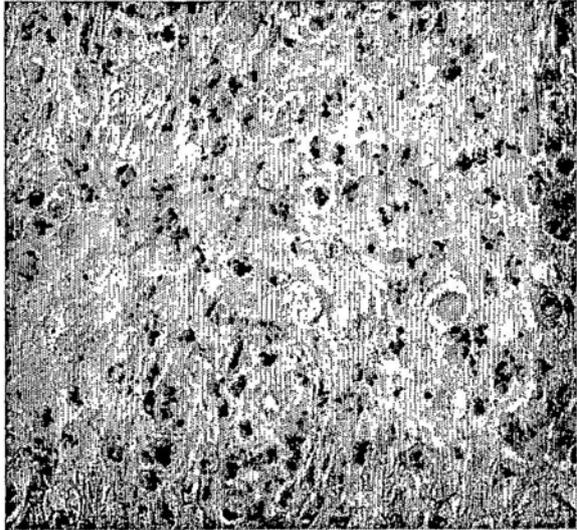


FIG. 5A

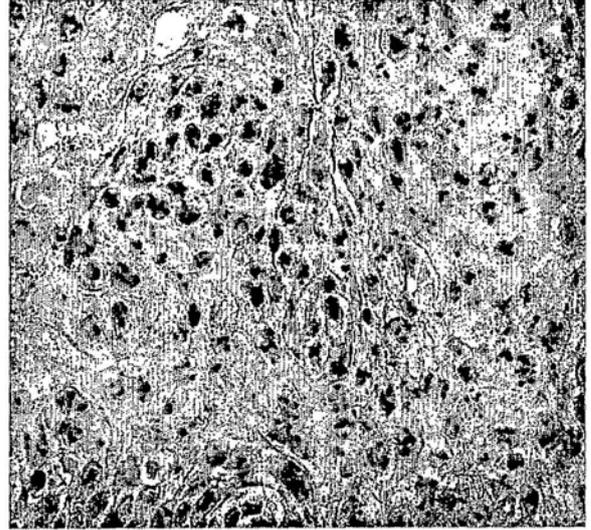


FIG. 5B

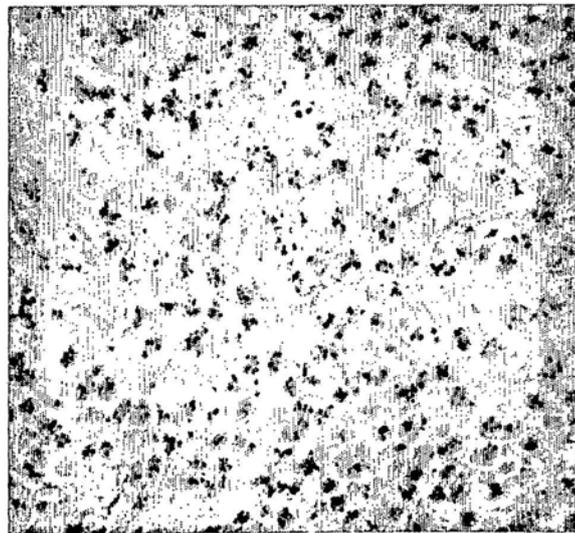


FIG. 5C

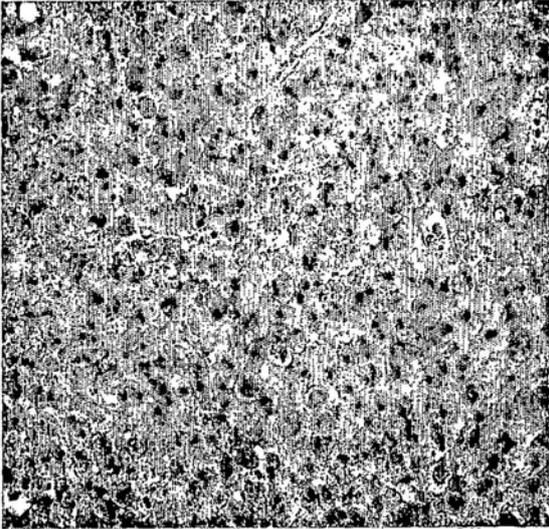


FIG. 6A

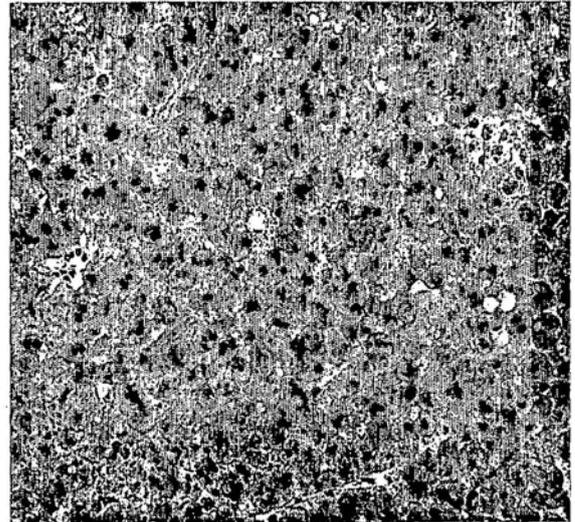


FIG. 6B

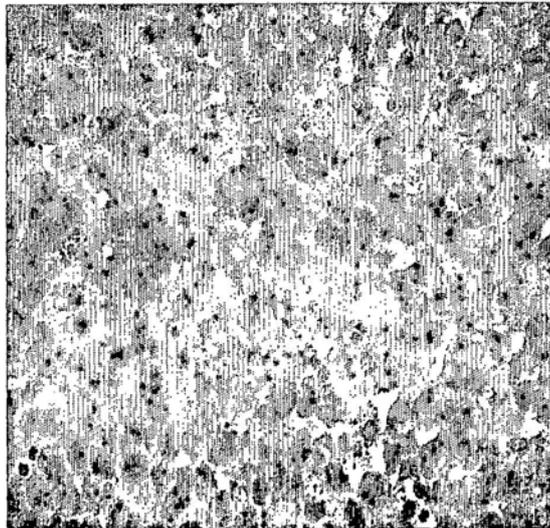


FIG. 6C

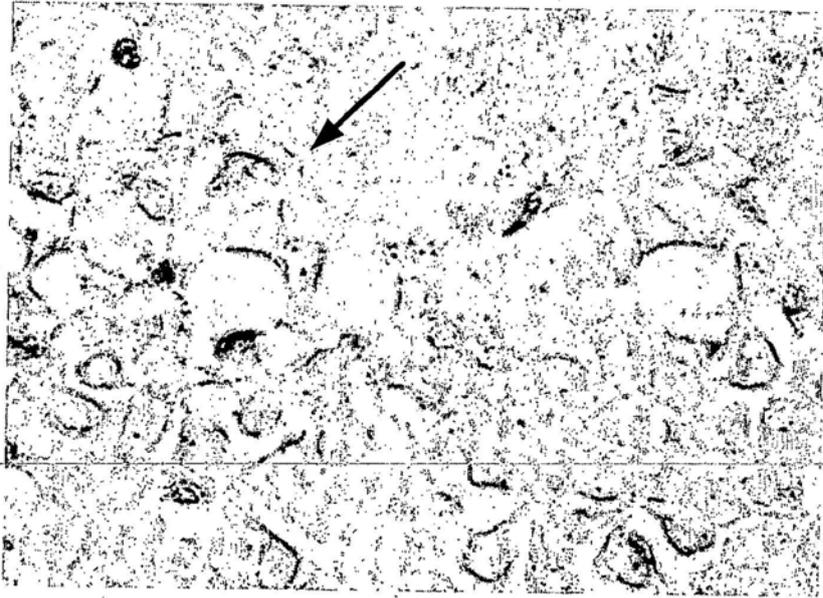


FIG. 7A

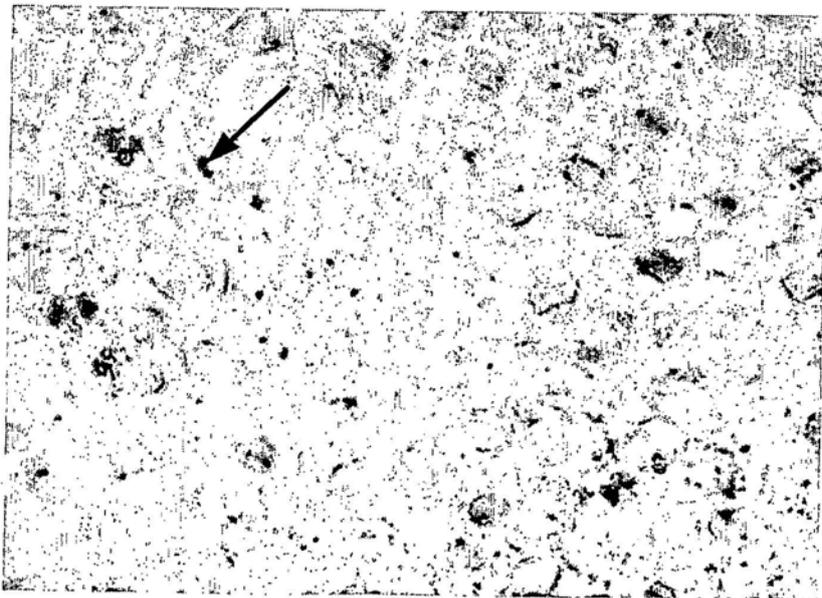


FIG. 7B

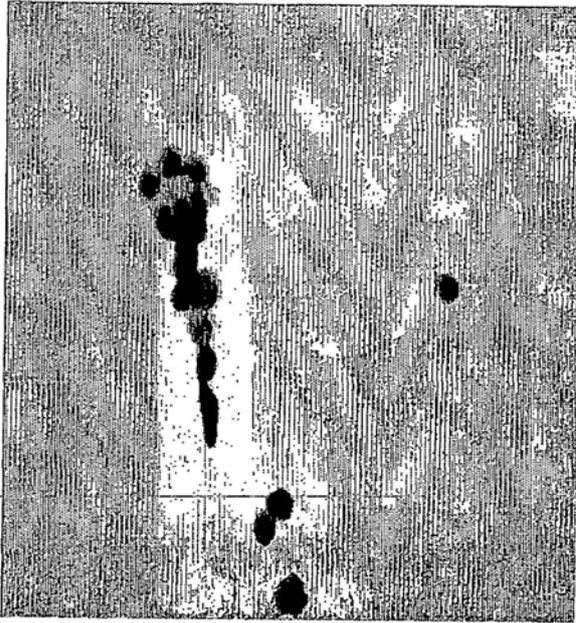


FIG. 8A

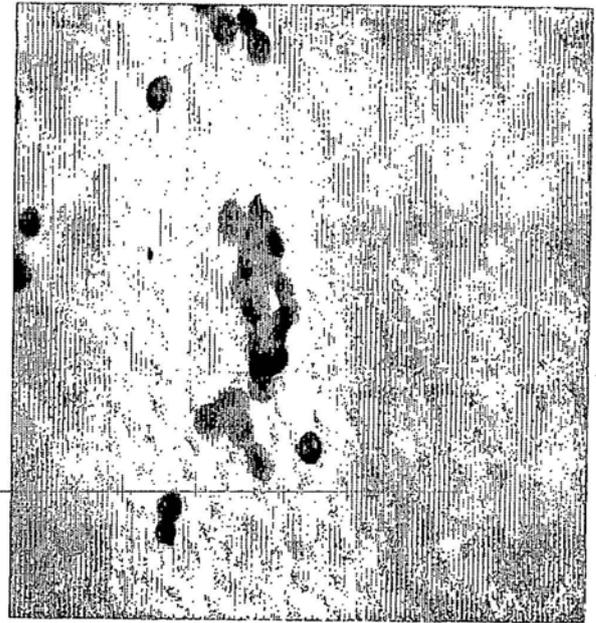


FIG. 8B

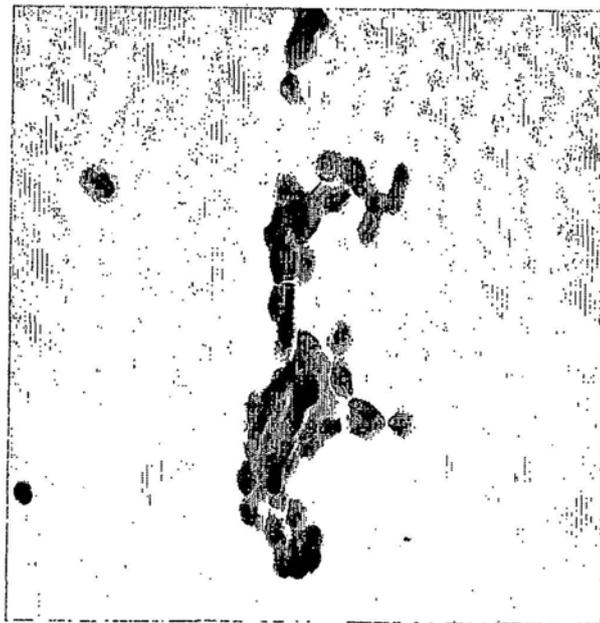


FIG. 8C

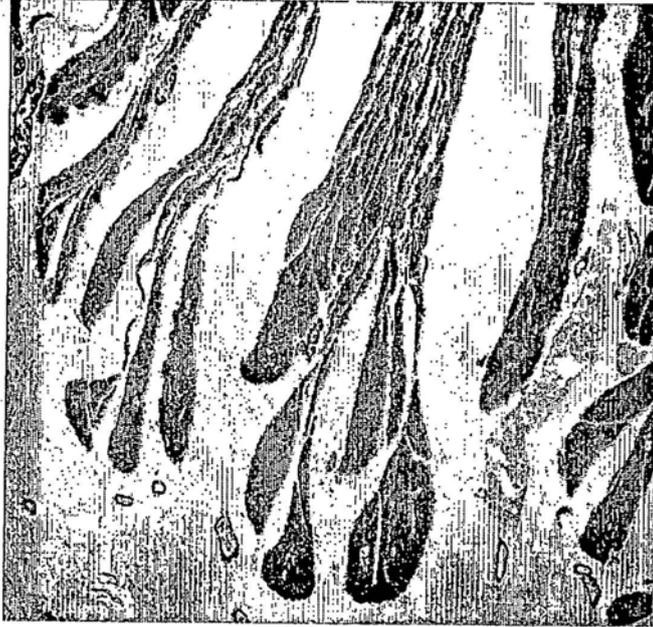


FIG. 9A



FIG. 9B

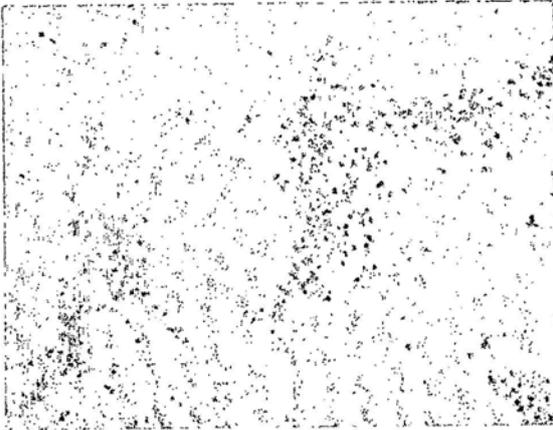


FIG. 10A

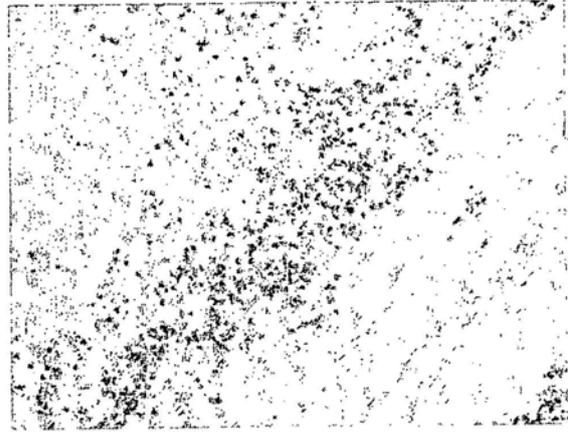


FIG. 10B

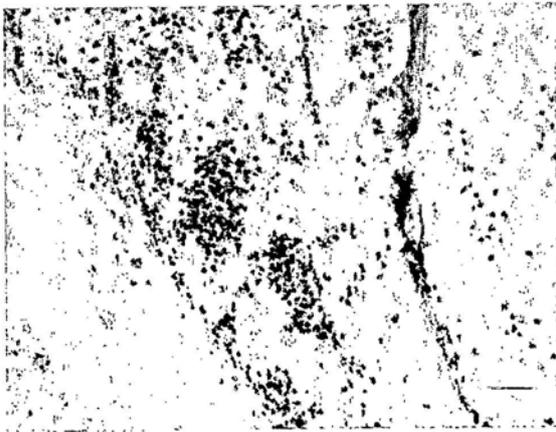


FIG. 10C

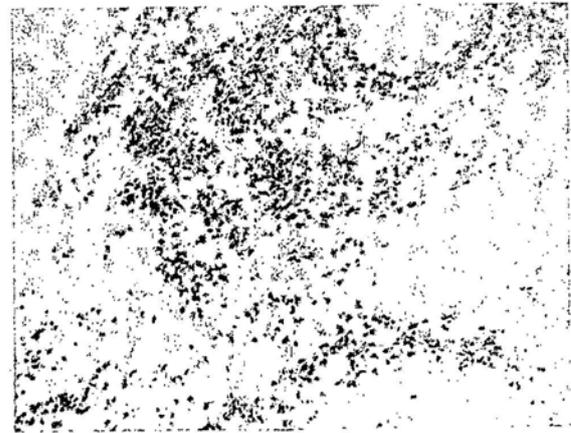


FIG. 10D

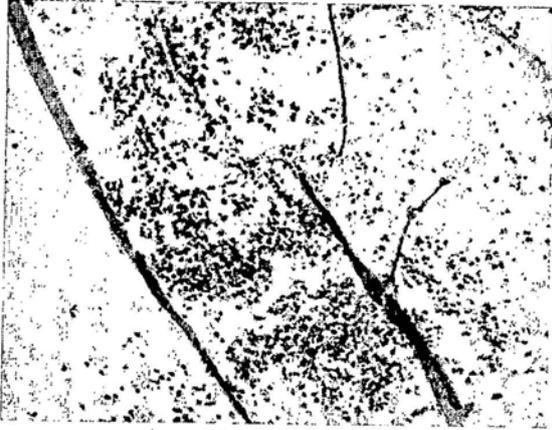


FIG. 10E

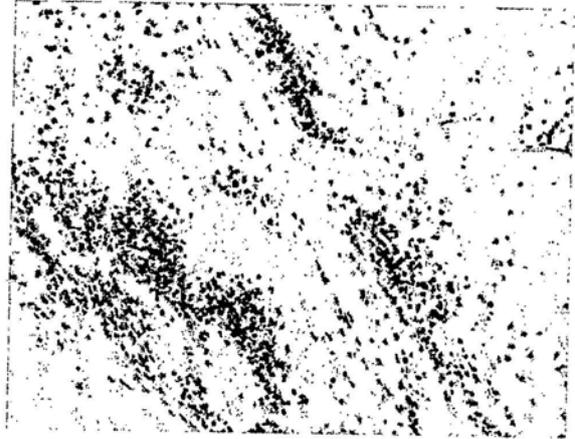


FIG. 10F

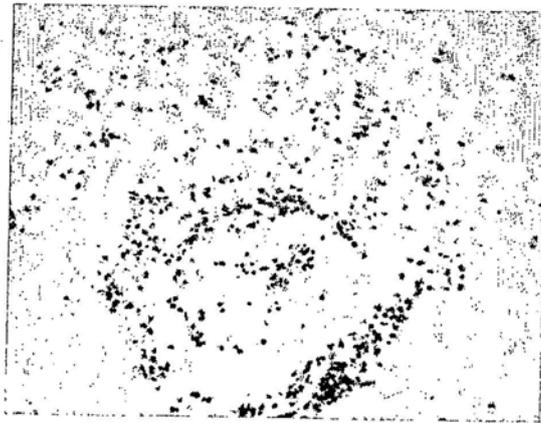


FIG. 10G