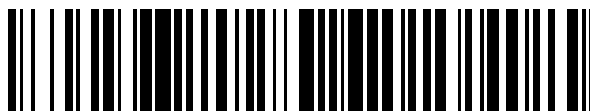


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 919**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2006 PCT/US2006/016087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2006 WO06116628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2006 E 06758689 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 1877101**

54 Título: **Enzimas conjugados con anticuerpos mediante un conector de PEG heterobifuncional**

30 Prioridad:

28.04.2005 US 675759 P

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

25.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 609 919 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

Enzimas conjugados con anticuerpos mediante un conector de PEG heterobifuncional

5 La presente invención se refiere a reactivos y a métodos para detectar una molécula de interés en una muestra biológica. Más concretamente, la presente invención se refiere a conjugados de anticuerpos, a métodos de empleo de dichos conjugados para detectar una molécula de interés en una muestra biológica tal como un corte de tejido, y a un método para preparar dichos conjugados.

10 Los conjugados covalentes de anticuerpos y las fracciones generadoras de señales se pueden emplear en los inmunoensayos para detectar moléculas diana específicas en muestras biológicas. La porción de anticuerpo de dichos conjugados se une específicamente a una diana contenida en la muestra y la fracción generadora de señales se utiliza para proporcionar una señal detectable que indica la presencia y/o la posición de la diana. Un tipo de conjugado ampliamente utilizado, sobre todo para análisis inmunohistoquímicos, es el formado por un anticuerpo y un enzima (conjugado anticuerpo-enzima). Una señal detectable es generada cuando se añade un sustrato a la muestra y la porción de enzima del conjugado transforma el sustrato en, por ejemplo, un producto coloreado, fluorescente o luminiscente en el sitio donde la porción de anticuerpo está unida a su diana.

20 En general los conjugados anticuerpo-enzima se preparan empleando reactivos de acoplamiento polifuncionales (típicamente bifuncionales) caracterizados por tener al menos dos grupos reactivos, uno de los cuales reacciona con un grupo funcional del anticuerpo y el otro con un grupo funcional del enzima. Sin embargo el acoplamiento puede inactivar el anticuerpo o el enzima o ambos a la vez, como consecuencia de efectos estéricos o de la reacción de los reactivos de acoplamiento con grupos funcionales localizados en porciones del enzima o del anticuerpo que son críticas para su actividad o especificidad.

25 Un procedimiento para minimizar la pérdida de especificidad del anticuerpo y de actividad del enzima consiste en emplear un esquema de acoplamiento que sea específico para restos concretos de aminoácido en el anticuerpo o en el enzima, o en ambos a la vez, no relacionados con sus actividades. Este procedimiento está ejemplificado por el método de conjugación específica para Fc descrito en la patente U.S. nº 5,191,066. En este método se introducen grupos sulfhidrilo (grupos tiol) específicamente en una región glicosilada de la porción Fc de un anticuerpo y se usan junto con una molécula conectora para unir covalentemente un enzima al anticuerpo. Como la porción Fc no influye en las propiedades de unión específica del anticuerpo, dichos conjugados conservan una mayor especificidad, lo cual aumenta la señal detectable para una molécula diana de interés y disminuye el ruido de fondo debido a la unión inespecífica.

30 Aunque la conjugación de sitio específico se puede usar para minimizar la pérdida de especificidad del anticuerpo y de actividad del enzima debida a la pérdida de grupos funcionales críticos, estos métodos no abordan la pérdida de especificidad del anticuerpo y de actividad del enzima a causa de efectos estéricos como los producidos por la agregación de múltiples conjugados y por interacciones entre el anticuerpo y el o los enzimas en un conjugado. Los efectos estéricos perjudiciales también pueden ser debidos a la reticulación accidental entre múltiples enzimas, anticuerpos y/o conjugados que tiene lugar durante la preparación de una composición de conjugados.

35 Un procedimiento para minimizar la pérdida de especificidad del anticuerpo y de actividad del enzima debida a efectos estéricos consiste en incrementar la longitud del reactivo de acoplamiento, a fin de que el anticuerpo y el enzima queden separados por una mayor distancia. Este procedimiento está ejemplificado por los métodos y los reactivos de conjugación revelados en la patente U.S. nº 5,053,520. En este método se usan conectores heterobifuncionales que tienen porciones extensas de restos alquilo, cicloalquilo, alquil-cicloalquilo y aromáticos para acoplar un anticuerpo a uno o más enzimas. Aunque dichos conectores contengan más átomos y proporcionen una mayor separación entre un anticuerpo y uno o más enzimas, se cree que el carácter hidrófobo de estos conectores incrementa la agregación perjudicial de conjugados en solución acuosa debido a efectos hidrófobos. Además estos conectores son suficientemente flexibles como para permitir interacciones perjudiciales dentro del conjugado entre el anticuerpo y el o los enzimas cuando un conjugado se pliega sobre sí mismo, minimizando su tamaño, a causa de los efectos hidrófobos.

45 En la patente U.S. nº 4,810,638 se describe un intento de minimizar la agregación perjudicial entre conjugados, que consiste en emplear conectores de bis-maleimidopolialquilen glicol homo-bifuncionales para preparar conjugados anticuerpo-enzima. Sin embargo el uso de tales conectores homo-bifuncionales puede provocar la reticulación de anticuerpos, enzimas y/o conjugados durante la preparación de los conjugados. La reticulación aumenta el tamaño medio y contrarresta en cierta medida el incremento de la solubilidad en agua que confiere el conector glicólico. Además la reticulación reduce la monodispersión en una composición de conjugados, lo cual puede tener efectos perjudiciales en la congruencia de los resultados, sobre todo en el caso de muestras tisulares y celulares, donde la detección de una diana con un conjugado puede estar limitada por la difusión a través de membranas celulares.

50 Ya se conocen algunos conectores hetero-bifuncionales de polietilenglicol, pero ningún intento de utilizarlos como reactivos de acoplamiento para la formación de conjugados anticuerpo-enzima. Pero tal como se revela en Chen y otros (Chen y otros, "The use of bifunctional polyethylene glycol derivatives for coupling of proteins to and cross-

linking of collagen matrices" [*Uso de derivados bifuncionales de polietilenglicol para acoplar proteínas a matrices de colágeno y reticularlas*], J. Mater. Sd. Mater. Med., 13: 1029-1035, 2002), estos agentes se han utilizado más bien para preparar matrices degradables a las que se han unido proteínas activas con fines de ingeniería de tejidos.

5 Para aumentar la señal generada por un determinado anticuerpo conjugado es conveniente conjugar varios enzimas con un solo anticuerpo. Sin embargo, a medida que sube el número de enzimas conjugados con un solo anticuerpo aumenta la probabilidad de que la actividad del conjugado quede afectada estéricamente debido al amontonamiento de muchos enzimas alrededor del único anticuerpo. Una manera de minimizar el amontonamiento de enzimas es utilizar un andamiaje para establecer una separación entre los enzimas y entre los enzimas y los anticuerpos o
10 fragmentos de anticuerpo. Las patentes U.S. nº 6,252,053 y 6,613,564, por ejemplo, describen el uso de andamiajes de polilisina o dextrano para aumentar la separación entre los enzimas, aunque sigue creciendo efectivamente el número de moléculas enzimáticas por cada componente específico de la unión [en concreto fragmentos F(ab')₂]. A pesar de que el método descrito en estas patentes incrementa el número medio de restos generadores de señal por cada componente específico de unión, el uso de un andamiaje polimérico (normalmente de baja monodispersión) aumenta el ruido de fondo y disminuye la reproducibilidad. El elevado peso molecular (típicamente >1 MDa) de tales constructos puede impedir la difusión y reduce la capacidad de penetración en tejidos/células y por tanto la señal.

En este contexto Bieniarz y otros (Bieniarz, Ch. y otros, Bioconjugate Chem., 7; 1996; p. 88-95) describen una serie de agentes de acoplamiento hetero-bifuncionales de longitud prolongada, para mejorar la unión del anticuerpo y
20 disminuir el impedimento estérico.

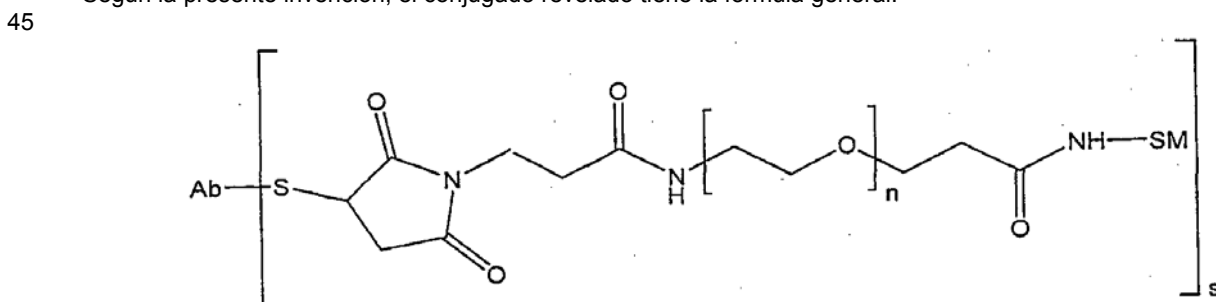
Park S. y otros (Journal of food Science Vol. 69, nº 6, 2004, M151-M156) revelan inmunoliposomas para el ensayo fluorométrico sándwich de detección de bacterias E. coli, en el cual el anticuerpo se une a la superficie liposómica mediante un conector peg-maleimido y la fluoresceína está encapsulada en los liposomas.

25 Por tanto lo que se necesita es un conjugado compuesto por un anticuerpo y un generador de señal, de manera que supere al menos las mencionadas limitaciones de los métodos anteriores. Sobre todo conjugados de anticuerpo y enzima (y métodos para prepararlos) que sean más pequeños pero mantengan la gran capacidad de generación de señales de aquellos conjugados en cuya composición hay mayores andamiajes.

30 Se revelan conjugados de anticuerpos con restos generadores de señales, así como métodos para prepararlos y usarlos. Los conjugados de anticuerpos revelados muestran un rendimiento superior de detección de moléculas de interés en muestras biológicas, en particular para la detección de tales moléculas en cortes tisulares y en muestras citológicas. En concreto los conjugados anticuerpo-enzima revelados conservan altas proporciones de especificidad del anticuerpo y de actividad del enzima, y así se intensifica la tinción, con menos ruido de fondo que el producido por los conjugados empleados actualmente para detectar antígenos en muestras biológicas.

En un aspecto, se revela un conjugado que incluye un anticuerpo unido covalentemente mediante un conector de polietilenglicol (PEG) hetero-bifuncional a un resto generador de señal que lleva un enzima o un punto cuántico. Según la presente invención, un conjugado revelado incluye un anticuerpo y un resto generador de señal unidos
40 covalentemente mediante un conector de PEG hetero-bifuncional que comprende un grupo succinimida y un grupo maleimida.

Según la presente invención, el conjugado revelado tiene la fórmula general:



50 donde Ab es un anticuerpo, SM es un resto generador de señal que lleva un enzima o un punto cuántico, n = 4 a 12 y s = 1 hasta 10 (por ejemplo, s = 2 hasta 6 o s = 3 hasta 4).

En otro aspecto se ofrecen métodos para preparar los conjugados revelados. En una forma de ejecución, un método de preparación de un anticuerpo conjugado incluye la formación de un anticuerpo tiolado a partir de un anticuerpo; la reacción de un resto generador de señal que posee un grupo amino con un conector bifuncional de éster activo de PEG maleimida, como el definido abajo, para producir un resto generador de señal activado; y la reacción del anticuerpo tiolado con el resto generador de señal activado para formar el conjugado del anticuerpo y el resto generador de señal, donde el resto generador de señal comprende un enzima o un punto cuántico. El anticuerpo tiolado se puede formar reduciendo los puentes de cistina intrínsecos del anticuerpo con un agente reductor.

En otro aspecto, se revelan métodos para detectar moléculas en muestras biológicas, empleando los conjugados revelados.

5 Las figuras muestran:

FIG. 1: una serie de imágenes de cortes tisulares teñidos inmunohistoquímicamente para Ki67 con un conjugado revelado, en comparación con un conjugado que incluye andamiaje, ambos antes y después del almacenamiento a 45°C durante 7 días.

10 FIG. 2: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de bcl-2.

FIG. 3: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de CD15.

FIG. 4: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de CD20.

15 FIG. 5: una serie de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y dos conjugados con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de CD23.

FIG. 6: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de CD57.

20 FIG. 7: una serie de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y dos conjugados con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de cerbB2.

FIG. 8: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de ciclina D1.

FIG. 9: una serie de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y dos conjugados con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de EGFR.

25 FIG. 10: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de ER.

FIG. 11: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de p53.

30 FIG. 12: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de PR.

FIG. 13: un par de imágenes comparando la intensidad de tinción de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje para la tinción inmunohistoquímica de PSA.

35 FIG. 14: un diagrama que presenta un esquema de detección metalográfica enzimática de la unión de una sonda de ácido nucleico marcada con hapteno a una secuencia de ácido nucleico diana que utiliza un conjugado de anticuerpo-enzima revelado.

FIG. 15: una serie de imágenes de cortes tisulares tratados para la detección metalográfica enzimática por ISH de una secuencia de ácido nucleico, usando un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje, ambos antes y después del almacenamiento a 45°C durante 7 días.

40 FIG. 16: un par de gráficas comparando la estabilidad de un conjugado revelado y un conjugado con andamiaje en un esquema de detección metalográfica enzimática.

FIG. 17: un cromatograma de exclusión de tamaños que compara el efecto de las variaciones del tiempo de reducción del anticuerpo en el perfil de PM de un conjugado revelado.

45 FIG. 18: un cromatograma de exclusión de tamaños que compara el efecto de las variaciones de tamaño y tipo del conector en el perfil de PM de conjugados revelados.

FIG. 19: una serie de imágenes comparando la intensidad de tinción de varios conjugados revelados respecto a un conjugado preparado con un conector de longitud prolongada sin PEG.

FIG. 20: un cromatograma de exclusión de tamaños que compara el efecto de las variaciones de un exceso de conector en el perfil de PM de un conjugado revelado.

50 FIG. 21: un cromatograma de exclusión de tamaños que compara el efecto de las variaciones de concentración de peroxidasa de rábano picante en el perfil de PM de un conjugado revelado.

FIG. 22: un cromatograma de exclusión de tamaños que compara el efecto de las variaciones de la relación entre anticuerpo y peroxidasa de rábano picante en el perfil de PM de un conjugado revelado.

55 I. Abreviaciones

2-ME - 2-mercaptoetanol

2-MEA - 2-mercaptoetilamina

Ab - anticuerpo

ALP - fosfatasa alcalina

60 BSA - albúmina de suero bovino

DTE - ditioeritritol (*cis*-2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano)

DTT - ditiotreitrol (*trans*-2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano)

EGFR - receptor del factor de crecimiento epidérmico

ER - receptor de estrógenos

65 HRP - peroxidasa de rábano picante

IHC - inmunohistoquímica

	ISH -	hibridación <i>in situ</i>
	MAL -	maleimida
	NHS -	<i>N</i> -hidroxi-succinimida
5	PEG -	polietilenglicol
	PR -	receptor de progesterona
	SAMSA -	ácido S-acetilmercaptosuccínico
	SATA -	S-acetiltioacetato de <i>N</i> -succinimidilo
	SATP -	acetil-tiopropionato de succinimidilo
10	SM -	resto generador de señal
	SMPT -	succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno
	SPDP -	3-(2-piridilditio)propionato de <i>N</i> -succinimidilo
	TCEP -	tris(carboxietil)fosfina

II. Términos

Los términos “un” y “el” incluyen tanto la forma singular como la forma plural de los referentes, a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.

El término “anticuerpo” se refiere en conjunto a inmunoglobulinas o a moléculas análogas a las inmunoglobulinas (incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, combinaciones de las mismas y moléculas análogas producidas durante una respuesta inmunológica en cualquier vertebrado, por ejemplo en mamíferos tales como humanos, cabras, ratas, conejos y ratones) y a fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a una molécula de interés (o a un grupo de moléculas muy similares de interés) excluyendo sustancialmente la unión a otras moléculas (por ejemplo anticuerpos o fragmentos de anticuerpo cuya constante de unión a la molécula de interés es al menos 10^3 M^{-1} mayor, 10^4 M^{-1} mayor o 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión a otras moléculas en una muestra biológica). Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos proteolíticos de anticuerpos [tales como los fragmentos $F(ab')_2$, los fragmentos Fab' , los fragmentos Fab' -SH y los fragmentos Fab , ya conocidos del estado técnico], fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como los fragmentos sFv, los fragmentos dsFv, los fragmentos sFv biespecíficos, diacuerpos y triacuerpos, ya conocidos del estado técnico) y anticuerpos de camélidos (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nº 6.015.695, 6.005.079, 5.874.541, 5.840.526, 5.800.988 y 5.759.808).

La frase “molécula de interés” se refiere a una molécula cuya presencia, situación y/o concentración se debe determinar. Como ejemplos de moléculas de interés cabe citar proteínas y secuencias de ácido nucleico marcadas con haptenos.

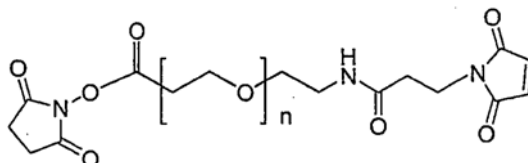
III. Resumen

En un aspecto se revela un conjugado de anticuerpo/resto generador de señal formado por un anticuerpo unido covalentemente a un resto generador de señal que incluye un enzima o un punto cuántico, mediante un conector heterobifuncional de polietilenglicol como el definido más adelante.

Como ejemplos de restos generadores de señal cabe citar 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, y puntos cuánticos que pueden obtenerse, por ejemplo, de Invitrogen Corporation, Eugene, OR; véanse por ejemplo las patentes U.S. nº 6,815,064, 6,682,596 y 6,649,138.

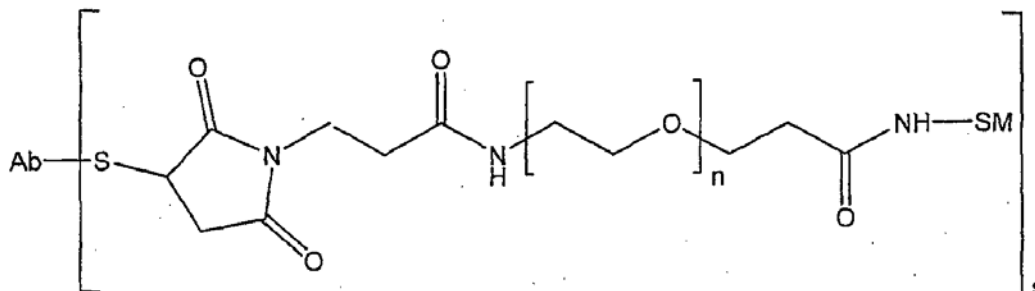
Cuando el resto generador de señal incluye un enzima, éste se usa en combinación con un compuesto cromógeno, fluorógeno o luminógeno para generar una señal detectable (se dispone de una gran variedad de tales compuestos, por ejemplo de Molecular Probes, Inc., Eugene OR). Como ejemplos concretos de compuestos cromógenos cabe citar la di-aminobenzidina (DAB), el 4-nitrofenilfosfato (pNPP), el rojo rápido, el fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), el azul nitro tetrazolio (NBT), el BCIP/NBT, el naranja AP, el azul AP, la tetrametilbencidina (TMB), el 2,2'-azinodi-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] (ABTS), la *o*-dianisidina, el 4-cloronaftol (4-CN), el nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), la *o*-fenilendiamina (OPD), el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido (X-Gal), el metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (MU-Gal), el *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNP), el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Gluc), el 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), la fucsina, el yodonitrotetrazolio (INT), el azul de tetrazolio y el violeta de tetrazolio.

Según la presente invención, el conector heterobifuncional es un conector heterobifuncional de polietilenglicol que tiene la fórmula:



donde $n = 4$ hasta 12. En formas de ejecución más concretas, un carbonilo de un grupo succinimida de este conector está unido covalentemente a un grupo amino del resto generador de señal y un grupo maleimida del conector está unido covalentemente a un grupo tiol del anticuerpo, o viceversa. En otras formas de ejecución más concretas hay aproximadamente por término medio entre 1 y 10 restos generadores de señal unidos covalentemente a un anticuerpo.

Según la presente invención, un conjugado de anticuerpo unido a un PEG heterobifuncional-resto generador de señal comprende un conjugado que tiene la fórmula:



donde Ab es un anticuerpo, SM es un resto generador de señal que lleva un enzima o un punto cuántico, $n = 4$ a 12 y $s = 1$ hasta 10 (por ejemplo, $s = 2$ hasta 6 o $s = 3$ hasta 4).

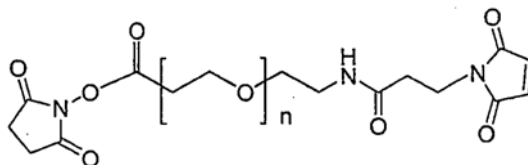
Aunque el anticuerpo empleado en los conjugados revelados se puede unir específicamente a cualquier molécula particular o a cualquier grupo particular de moléculas muy similares, en formas de ejecución concretas el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-hapteno (que puede utilizarse para detectar una secuencia de sonda marcada con hapteno dirigida a una secuencia de ácido nucleico de interés) o un anticuerpo que se une específicamente a una proteína particular o a una forma de la misma (como por ejemplo una forma fosforilada de una proteína), que pueden hallarse en una muestra. Los haptenos son moléculas orgánicas pequeñas que son fijadas específicamente por anticuerpos, aunque por sí mismas no pueden producir ninguna respuesta inmunológica en un animal y primero tienen que unirse a una molécula portadora más grande, tal como una proteína o un ácido polinucleico, para generar una respuesta inmunológica. Como ejemplos de haptenos cabe citar el dinitrofenol, la biotina y la digoxigenina. En otras formas concretas de ejecución adicionales 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.

Los conjugados de anticuerpo revelados se pueden utilizar para detectar moléculas de interés en cualquier tipo de inmunoensayo de unión, incluyendo los ensayos de unión inmunohistoquímica. En una forma de ejecución los conjugados de anticuerpo revelados se usan como anticuerpo primario marcado en un inmunoensayo, por ejemplo como un anticuerpo primario dirigido contra una molécula particular o contra una molécula marcada con hapteno. O, cuando la molécula de interés es multiepitópica, se puede usar una mezcla de conjugados dirigidos a los múltiples epítomos. En otra forma de ejecución, los conjugados revelados se emplean como anticuerpos secundarios en un inmunoensayo (por ejemplo, dirigidos contra un anticuerpo primario que se une a la molécula de interés, la cual puede ser fijada por dos anticuerpos primarios en un ensayo tipo sándwich cuando es multiepitópico). En otra forma más de ejecución se usan mezclas de conjugados revelados para amplificar una señal debida a una molécula de interés fijada por un anticuerpo primario (la molécula de interés puede ser fijada por dos anticuerpos primarios en un ensayo tipo sándwich). Por ejemplo, un primer conjugado de una mezcla se dirige a un anticuerpo primario que se une a una molécula de interés y un segundo conjugado se dirige a la porción de anticuerpo del primer conjugado, localizando así más restos generadores de señal en el sitio de la molécula de interés. Los especialistas en la materia apreciarán fácilmente en qué otro tipo de ensayos se pueden usar los conjugados revelados.

En otro aspecto se revela un método para preparar un conjugado de anticuerpo-resto generador de señal, el cual consiste en formar un anticuerpo tiolado a partir de un anticuerpo; hacer reaccionar un resto generador de señal que lleva un grupo amino con un conector bifuncional de éster activo de PEG maleimida, como el definido abajo, para producir un resto generador de señal activado; y hacer reaccionar el anticuerpo tiolado con el resto generador de señal activado para formar el conjugado de anticuerpo-resto generador de señal, donde el resto generador de señal comprende un enzima o un punto cuántico. Un anticuerpo tiolado se puede formar haciendo reaccionar el anticuerpo con un agente reductor para producir el anticuerpo tiolado, por ejemplo haciendo reaccionar el anticuerpo con un agente reductor para formar un anticuerpo tiolado que tenga un número medio de tioles por anticuerpo comprendido entre 1 y 10 aproximadamente. El número medio de tioles por anticuerpo se puede determinar por valoración. Como ejemplos de agentes reductores cabe mencionar los seleccionados del grupo constituido por 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina, DTT, DTE y TCEP, y combinaciones de ellos. En una forma de ejecución particular el agente reductor se elige del grupo formado por DTT y DTE, y combinaciones de ellos, y se usan a una concentración entre 1 mM y 40 mM aproximadamente.

Conforme a la presente invención, la reacción del resto generador de señal con un conector bifuncional de éster activo de PEG maleimida para producir un resto generador de señal activado consiste en hacer reaccionar el resto generador de señal con un éster activo de PEG maleimida que tiene la fórmula:

5



donde $n = 4$ hasta 12. El resto generador de señal puede ser, por ejemplo, un enzima (tal como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina).

10

En otro aspecto más se revela un método para detectar una molécula de interés en una muestra biológica, el cual consiste en poner en contacto la muestra biológica con un conjugado heterobifuncional de la presente invención, formado por un anticuerpo unido a PEG-resto generador de señal, y detectar una señal generada por el conjugado de anticuerpo-resto generador de señal. La muestra biológica puede ser cualquier muestra que contenga moléculas biológicas (tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hormonas, etc.), pero en formas de ejecución concretas la muestra biológica incluye un corte de tejido (como el obtenido por biopsia) o una muestra citológica (como un frotis de Papanicolau o un frotis de sangre). En una forma de ejecución particular, el conjugado heterobifuncional de anticuerpo unido a PEG-resto generador de señal incluye un anticuerpo unido covalentemente a un enzima tal como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina. En otras formas de ejecución particulares, el conjugado heterobifuncional de anticuerpo unido a PEG-resto generador de señal incluye un anticuerpo unido covalentemente a un punto cuántico.

15

20

En un método más particular el resto generador de señal comprende un enzima tal como la fosfatasa alcalina y además el método consiste en poner en contacto la muestra biológica con un ion metálico soluble en agua y un substrato redox inactivo del enzima que es convertido en agente redox activo por el enzima, con lo cual el agente redox activo reduce el ion metálico haciéndolo precipitar (véase por ejemplo la solicitud de patente conexas pendiente U.S. nº 11/015,646, registrada el 20 de diciembre de 2004, la publicación PCT nº 2005/003777 y la publicación de solicitud de patente U.S. nº 2004/0265922). En otra forma de ejecución particular el resto generador de señal incluye un enzima óxido-reductasa (tal como la peroxidasa de rábano picante) y además el método consiste en poner en contacto la muestra biológica con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor (véase por ejemplo la patente U.S. nº 6,670,113).

25

30

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar más detalladamente ciertos aspectos de la presente invención.

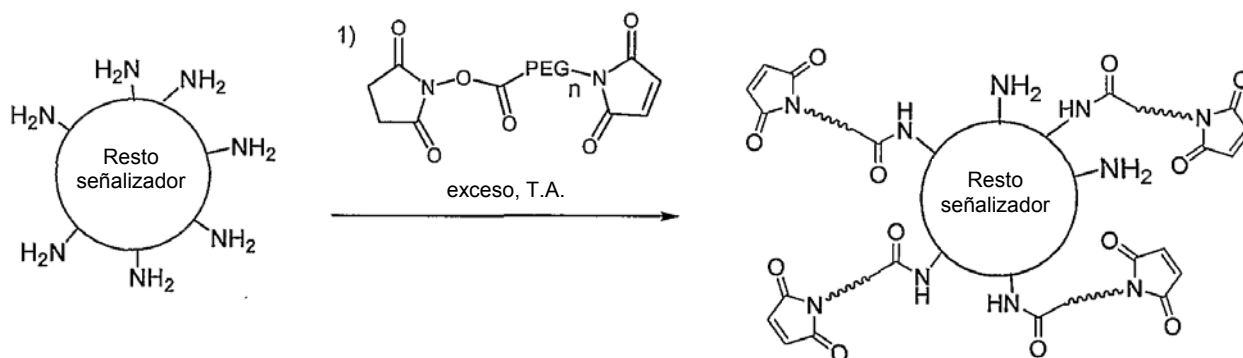
35

A. Preparación de conjugados de anticuerpo-resto generador de señal mediante el uso de ésteres activos de maleimida PEG

En una forma de ejecución se prepara un conjugado revelado de anticuerpo-resto generador de señal según los procesos descritos abajo en los esquemas 1 hasta 3, donde el conector heterobifuncional de polietilenglicol es un conector de polietilenglicol que posee un grupo amino reactivo (éster activo) y un grupo tiol reactivo (maleimida). Como muestra el esquema 1, un resto generador de señal (tal como un enzima o un punto cuántico) que dispone de uno o más grupos amino se hace reaccionar con un exceso del conector para formar un resto generador de señal activado.

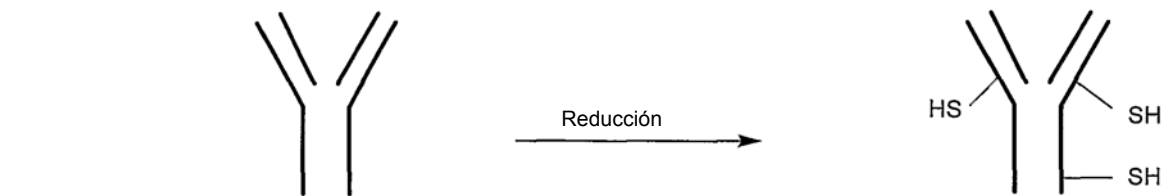
40

45



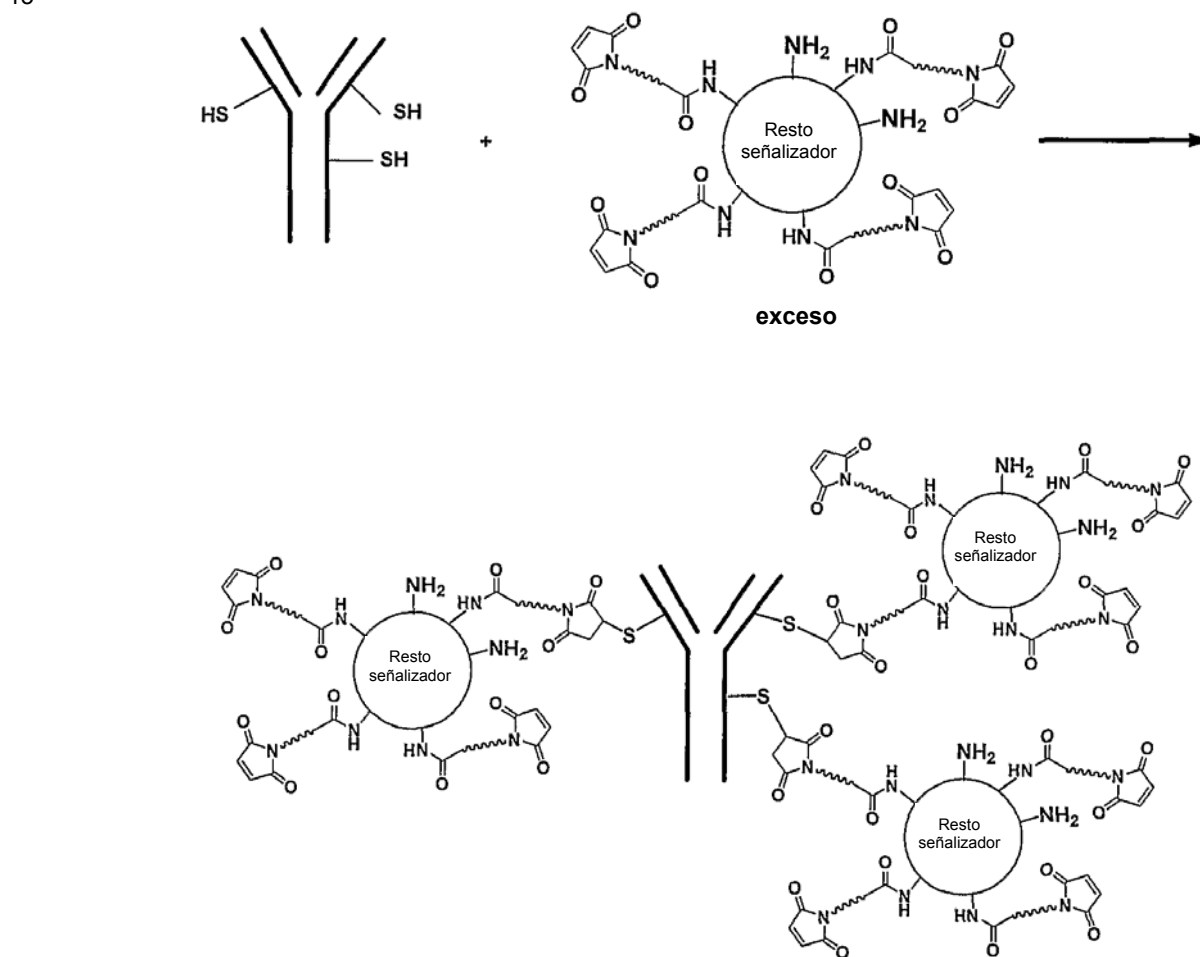
Esquema 1

5 Los grupos tiol se introducen en el anticuerpo tratándolo con un agente reductor tal como el DTT, según lo que muestra el esquema 2. Un agente reductor suave como el DTE o el DTT se usa a una concentración comprendida entre 1 mM y 40 mM aproximadamente (por ejemplo a una concentración entre 5 mM y 30 mM aproximadamente o entre 15 mM y 25 mM aproximadamente) para introducir un número limitado de tioles (por ejemplo entre 2 y 6 aproximadamente) en el anticuerpo, manteniéndolo estable (lo cual se puede determinar por cromatografía de exclusión de tamaños).



Esquema 2

15 Los componentes producidos según los esquemas 1 y 2 se combinan luego para obtener un conjugado, tal como muestra el esquema 3.



Esquema 3

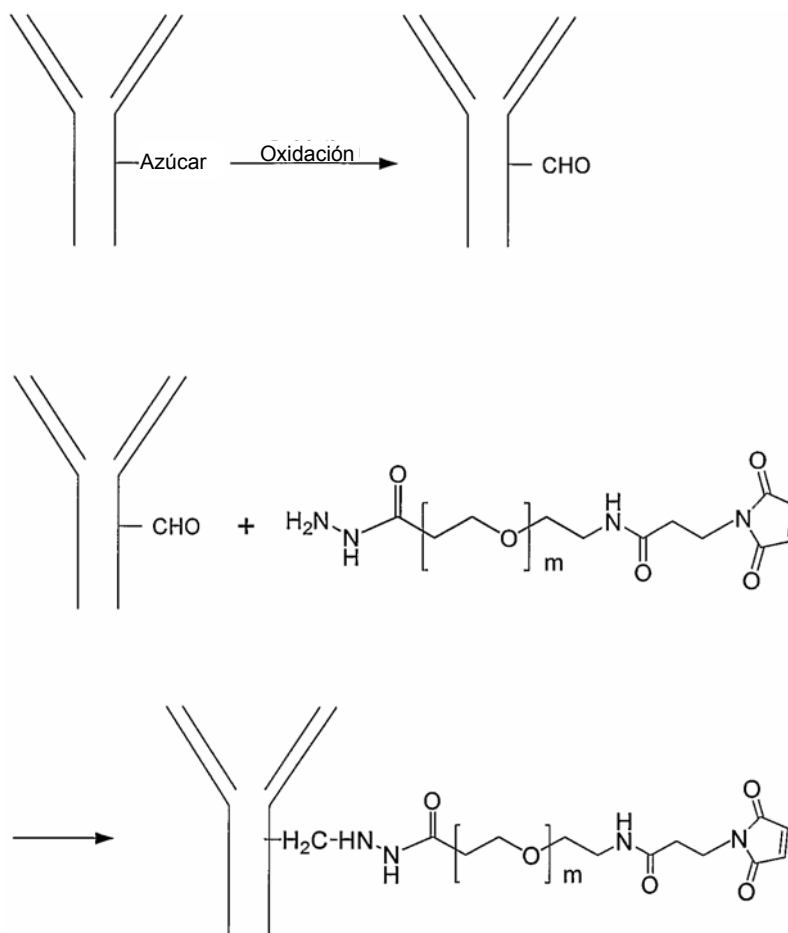
20 Aunque los esquemas 1-3 ilustran un proceso óptimo para los ésteres activos de maleimida PEG, en el cual el resto generador de señal se activa primero haciendo reaccionar un grupo amino con el éster activo del conector para formar un resto generador de señal activado, también cabe la posibilidad de activar primero el anticuerpo haciendo reaccionar un grupo amino o tiol del anticuerpo con el conector y luego haciendo reaccionar el anticuerpo activado con el resto generador de señal [que tiene un grupo tiol o amino para reaccionar apropiadamente con el grupo reactivo restante del conector]. Asimismo, aunque en el esquema 3 se muestran 3 restos generadores de señal,

25

cabe la posibilidad de unir varios anticuerpos a un solo resto generador de señal o cualquier número de restos generadores de señal a un solo anticuerpo.

5 Como alternativa se activa un anticuerpo para conjugarlo luego a un resto generador de señal, tal como se indica en los siguientes esquemas 4 y 5. En el esquema 4 se activa el anticuerpo en lugar del resto generador de señal, tal como mostraba el esquema 1. En la forma de ejecución particular del esquema 4, primero se oxida un resto de azúcar (como el localizado en una región glicosilada de la porción Fc del anticuerpo) para dar un grupo aldehído que luego se hace reaccionar con un grupo del conector capaz de reaccionar con aldehído (tal como un grupo hidrazida del conector de maleimida/hidrazida PEG representado).

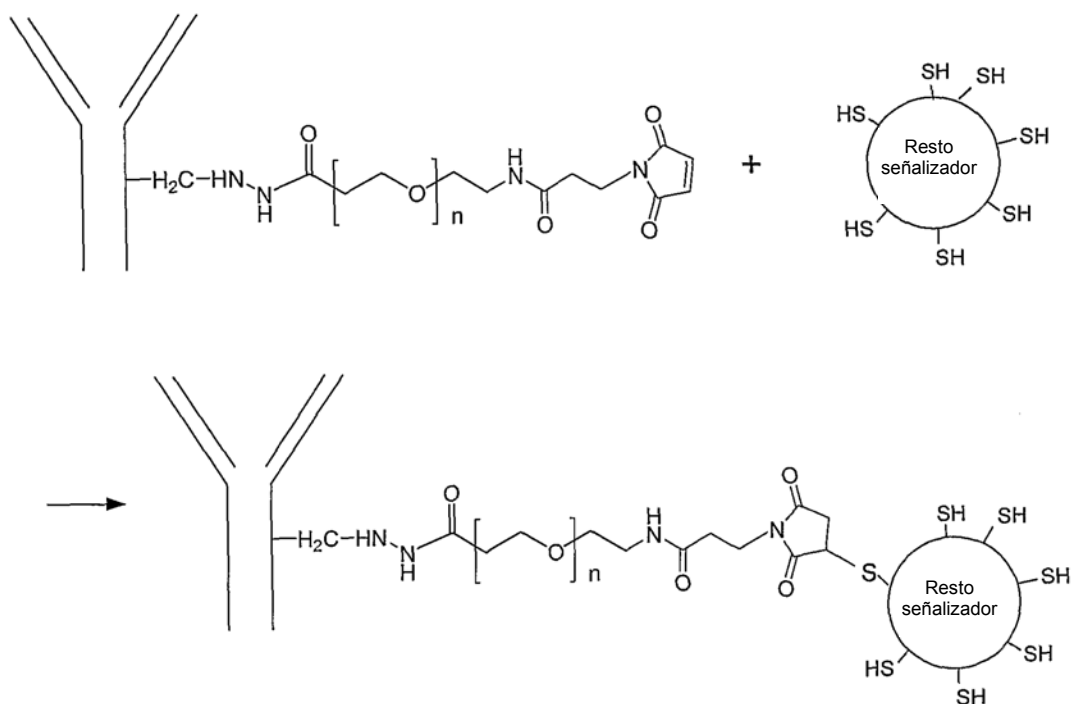
10



Esquema 4

15 Después, tal como muestra el esquema 5, se hace reaccionar un grupo tiol reactivo de la porción conectora del anticuerpo activado (tal como un grupo maleimida representado) con un grupo tiol del resto generador de señal. De nuevo se puede invertir el proceso, haciendo reaccionar en primer lugar el conector con un grupo aldehído del resto generador de señal (producido, por ejemplo, mediante la oxidación de un resto de azúcar) para formar un resto generador de señal activado, y luego el resto generador de señal activado puede hacerse reaccionar con un grupo tiol del anticuerpo. Asimismo, aunque los esquemas 4 y 5 solo muestran un único conector uniéndose a un único resto generador de señal, debe entenderse que también es posible unir múltiples restos generadores de señal a un solo anticuerpo o varios anticuerpos a un solo resto generador de señal.

20



Esquema 5

5 B. Preparación de conjugados anticuerpo-peroxidasa de rábano picante

Activación de HRP

La HRP se puede activar para la conjugación, por ejemplo, mediante tratamiento con un exceso 100 veces molar de un conector de PEG bifuncional que tiene un grupo maleimida y un grupo éster activo (por ejemplo los conectores MAL-PEG₄-NHS, MAL-PEG₈-NHS o MAL-PEG₁₂-NHS comercializados por Quanta Biodesign, Powell, OH) a la temperatura ambiente (23 – 25°C) durante 60 minutos. Tras la purificación a través de una columna Superdex 200 10/300 GL se obtiene HRP libre de exceso de conector, típicamente con cinco hasta siete maleimidias, mediante un exceso 100 veces molar. Abajo se resume un ejemplo de procedimiento para la producción de un conjugado de HRP-anticuerpo mediante el empleo de un conector MAL-PEG₄-NHS. El número de grupos maleimida en una HRP activada se puede determinar por el método descrito detalladamente en el ejemplo D.

HRP-PEG₄-maleimida (1): en un vial ámbar de 4 ml se introdujeron 78,8 mg (100 eq.) de éster de MAL-dPEG₄[®] NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH, peso fórmula = 513,50), seguido de 2,46 ml (61,5 mg, 1,53 μM) de HRP (peroxidasa de rábano picante, Pierce, Rockford, IL Lot FJ925901) en forma de solución de 25 mg/ml en fosfato sódico 0,1 M, de pH 7,5. Luego el vial se colocó sobre un girador automático en la oscuridad a temperatura ambiente (23 – 25°C) y la reacción de formación del enlace amida se dejó proceder durante 1 hora. Después se tomó un alícuota de 400 μl para purificación y el resto de la solución se conservó temporalmente a 4°C. Luego se obtuvo HRP-PEG₄-maleimida pura fraccionando la muestra en un purificador Akta equipado con una columna Superdex 10/300 (Amersham, Piscataway, NJ) eluida con 1,0 ml / min de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5. Se juntaron las fracciones que contenían HRP, obteniéndose 2,0 ml de una solución de 4,52 mg / ml de HRP-PEG₄-maleimida (90% de recuperación) según la medición por espectrofotometría UV/VIS, utilizando un coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1% (pH 6,5) igual a 6,52.

30 Introducción de tioles en anticuerpos

Para activar un anticuerpo con el fin de conjugarlo, por ejemplo un anticuerpo anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo, el anticuerpo se puede incubar con 25 mmoles de DTT a temperatura ambiente (23 – 25°C) durante 25 minutos. Tras la purificación a través de una columna PD-10 SE se obtiene anticuerpo libre de DTT, normalmente con dos a seis tioles libres (esquema 2). El ejemplo de procedimiento descrito para la introducción de tiol en un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón puede aplicarse en general a otros anticuerpos. El número de tioles por anticuerpo se puede determinar mediante el ensayo de tiol descrito en el ejemplo D.

Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-tiol (2): en un vial ámbar de 8 ml se introdujeron 4,11 ml de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Bethyl, Montgomery, TX) en forma de una solución de 3,01 mg / ml en fosfato sódico 0,1 M, EDTA 1,0 mM, pH 6,5. A esta solución se le añadieron 216 μl de una solución 500 mM del agente reductor DTT (1,4-ditiotreitól, de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) recién preparada. El vial se colocó sobre un girador automático en la

oscuridad y la reducción del disulfuro se dejó proceder durante 25 minutos. La solución reactiva se dividió en cuatro volúmenes iguales (debido a la capacidad limitada de la columna desalinizadora empleada) y el exceso de DTT se eliminó pasando cada una de las fracciones a través de una columna desalinizadora PD-10 eluida con fosfato sódico 0,1 M, EDTA 1,0 mM, pH 6,5. Las fracciones que contenían anticuerpo se combinaron para obtener 8,0 ml de una solución de 1,22 mg / ml de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-SH libre de DTT (78 % de recuperación) según la medición por espectrofotometría UV/VIS, utilizando un coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1%, de pH 6,5 igual a 14.

Conjugación HRP-Anticuerpo

A un anticuerpo tiolado (tal como anti-IgG de ratón-tiol o como anti-IgG de conejo-tiol) se le añade un exceso tres veces molar de HRP-PEG₄-maleimida. Luego la reacción se incubó a la temperatura ambiente (23 – 25°C) durante 16 horas. Tras la purificación a través de una columna Superdex 200 10/300 GL SE se obtiene un conjugado con un promedio de 2 o 3 HRP por anticuerpo. El número de HRP por anticuerpo se determina midiendo la relación entre absorbancias del conjugado a 280 nm / 403 nm y realizando los cálculos descritos en la sección del ejemplo D. A continuación se describe un ejemplo del procedimiento.

HRP-PEG₄-anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón IgG(3): en un vial ámbar de 8 ml se introdujeron 4,0 ml de la solución (2) de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-tiol (1 eq., 4,88 mg, 0,0326 μ moles) y 864 μ l de la solución (1) de HRP-PEG₄-maleimida (3 eq., 3,91 μ g, 0,0976 μ moles). El vial se colocó después sobre un girador automático en la oscuridad a temperatura ambiente (23 – 25°C) y la reacción de Michael se dejó proceder durante 16 horas. Luego se obtuvo un conjugado HRP-PEG₄-anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón libre de anticuerpo y de HRP fraccionando la muestra en un purificador Akta equipado con una columna Superdex 10/300 (Amersham, Piscataway, NJ) eluida con 0,9 ml / minuto de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5. Después de reunir las fracciones se obtuvieron 9,73 ml de una solución de 1,04 mg / ml de conjugado, tal como se determinó mediante el ensayo de proteínas Coomassie Plus de Pierce descrito en el ejemplo C. Luego el conjugado se almacenó en un recinto frío a 4°C hasta su uso.

C. Caracterización del PM de los conjugados anticuerpolenzima

Para ilustrar la mayor monodispersión de los conjugados revelados se determinaron los perfiles de PM de un total de doce ejemplos de conjugados revelados (en concreto ocho conjugados HRP-anti-IgG de ratón y cuatro conjugados HRP-anti-IgG de conejo) por cromatografía de exclusión de tamaños en un purificador Akta provisto de una columna Superdex 200 10/300 GL (Amersham, Piscataway, NJ) eluida con 0,5-1,0 ml / min de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5. Como patrones de calibración del peso molecular se emplearon: aldolasa (158 kDa), catalasa (232 kDa), ferritina (440 kDa), tiroglobina (669 kDa), ribonucleasa A (13,7 kDa), quimotripsinógeno (25 kDa), ovoalbúmina (43 kDa) y albúmina (67 kDa). Los conjugados examinados dieron un PM medio comprendido aproximadamente entre 230 y 330 kDa, con un intervalo global aproximado de PM de 190-550 kDa para un determinado conjugado. Al reinyectar conjugados purificados se demostró que los conjugados estaban exentos de HRP y anticuerpo no conjugado.

D. Procedimientos analíticos para la determinación de los conjugados

Para determinar el contenido de maleimida y de tiol, así como el número de moléculas de HRP por conjugado, se pueden emplear los siguientes métodos representativos.

Procedimiento de placas de microvaloración (Pierce)

Equipo y materiales:

ASB de Pierce (Rockford, IL)
 Reactivo Coomassie Plus[®] de Pierce (Rockford, IL)
 Placa de microvaloración BIO-TEK Synergy HT

Lector de placas

Procedimiento:

1. Encender el lector de placas y dejar calentar durante al menos 30 minutos a 595 nm.
2. Preparar una serie de patrones de ASB (1,0, 0,5, 0,25 y 0,125 mg/ml) en agua desionizada.
3. Pipetear por triplicado 15 μ l del blanco y de cada patrón y muestra desconocida en los pocillos apropiados de la placa de microvaloración.
4. Añadir 300 μ l del reactivo Coomassie Plus[®] a cada pocillo y homogeneizar durante 30 segundos con el agitador de placas.
5. Retirar la placa del agitador. Para que los resultados sean más consistentes, incubar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Medir la absorbancia a 595 nm con el lector de placas.

ES 2 609 919 T3

7. Restar la medición promedio a 595 nm de los duplicados en blanco de las mediciones a 595 nm de todos los demás duplicados de cada patrón y muestra desconocida (efectuado automáticamente por el lector de placas).
8. Preparar una curva estándar representando gráficamente las mediciones a 595 nm de cada patrón de ASB corregidas por el blanco promedio frente a su concentración en $\mu\text{g} / \text{ml}$. Usar la curva estándar para determinar la concentración de proteína de cada muestra desconocida (efectuado por el lector de placas).

Determinación del contenido de Ab-tiol y de HRP-PEG₄-maleimida

Equipo y materiales:

Mercaptoetanol, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ
Reactivo de Ellman, Pierce, Rockford, IL

Fosfato sódico
EDTA

Preparación de materiales:

- Tampón de reacción: fosfato sódico 0,1 M; EDTA 1 mM, pH 8,0.
- Mercaptoetanol (BME): PM = 78,3, d = 1,114 g / ml.

Procedimiento:

1. Encender el lector de placas y dejar calentar durante al menos 30 minutos a 412 nm.
2. Preparar patrón de trabajo: 7 μl de BME en 5 ml de tampón de reacción.
3. Preparar por triplicado una serie de patrones de BME del modo descrito a continuación.

Patrón	Volumen de tampón de reacción		Conc, final
Patrón estándar	900 μl	100 μl de patrón de trabajo	2 mM
Patrón 1	500 μl	500 μl de patrón estándar	1 mM
Patrón 2	500 μl	500 μl de patrón 1	0,5 mM
Patrón 3	500 μl	500 μl de patrón 2	0,25 mM
Patrón 4	500 μl	500 μl de patrón 3	0,125 mM
Patrón 5	500 μl	500 μl de patrón 4	0,0625 mM
Patrón 6	500 μl	500 μl de patrón 5	0,03125 mM
Patrón 7	500 μl	500 μl de patrón 6	0,015625 mM
Patrón 8 (blanco)	1000 μl		0 mM

4. Si se ensaya HRP-PEG₄-MAL, añadir 160 μl de muestra a 160 μl de patrón 1 e incubar durante 30 minutos. Esta mezcla sirve como muestra desconocida para las muestras de HRP-PEG₄-MAL. Añadir 100 μl de esta muestra desconocida al correspondiente pocillo, tal como se describe en el paso 5.
5. Añadir 100 μl de cada patrón o muestra desconocida a los respectivos pocillos de una placa de microvaloración (adjuntar plantilla).
6. Preparar una solución de reactivo de Ellman. Solución de reactivo de Ellman: disolver 8 mg de reactivo de Ellman en 2 ml de tampón de reacción.
7. Añadir 20 μl de la solución del reactivo de Ellman a cada pocillo que contiene patrón o muestra desconocida.
8. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. Medir la absorbancia a 412 nm con el lector de placas.
10. Si solo se dispone de datos primarios, representar gráficamente los valores obtenidos de los patrones para crear una curva estándar.

Análisis:

Las concentraciones experimentales (mM de tiol) se determinan a partir de la curva estándar, la cual da la ecuación: $Y = mX + b$, donde $Y = \text{DO}_{412\text{nm}}$, $X = \text{mM de tiol}$, $m = \text{pendiente (obtenida de la ecuación de la curva estándar)}$, y $b = \text{a la intersección con el eje x (obtenida de la ecuación de la curva estándar)}$.

La concentración de proteína de cada muestra en mM se determina dividiendo la concentración de proteína en mg/ml (obtenida del ensayo de proteína total) por el peso fórmula de la muestra y multiplicando por 1000. Luego el número de tioles por molécula de anticuerpo se obtiene dividiendo la concentración experimental de tioles en mM obtenida arriba por la concentración de proteína en mM obtenida del paso previo. El número de maleimidias por molécula de peroxidasa de rábano picante se calcula restando primero de 0,5 mM la concentración experimental de tiol en mM obtenida arriba y multiplicando luego esta diferencia por 2 y dividiendo por la concentración de proteína en mM.

Un típico rango de tiolación de un anticuerpo está comprendido aproximadamente entre 1 y 10 tioles por molécula de anticuerpo, tal como aproximadamente entre 2 y 6, por ejemplo entre 2 y 4. Un típico rango del número de grupos maleimida incorporados por molécula de HRP está comprendido aproximadamente entre 1 y 10, tal como entre 3 y 8 aproximadamente, por ejemplo entre 5 y 7.

5

Determinación del número de HRP por anticuerpo

Constantes

- 10 • Peso molecular de la HRP = 40.000 Da
- Peso molecular del anticuerpo = 150.000 Da
- Coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1 por ciento (1 mg/ml) de HRP = 6,52
- Coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1 por ciento (1 mg/ml) del anticuerpo = 14
- 15 • Absorbancia de HRP a 403 nm / absorbancia de HRP a 280 nm = 2,90 (este valor se mide para cada lote distinto de HRP)

Cálculos

- 20 1) Determinar la contribución de la HRP a la absorbancia del conjugado a 280 nm, midiendo la absorbancia del conjugado a 403 nm y aplicando la ecuación: absorbancia de HRP a 403 nm / 2,90 = absorbancia de HRP a 280 nm.
- 2) A partir del valor obtenido en 1 determinar la cantidad de HRP en mg/ml mediante la ecuación: absorbancia de HRP a 280 nm / 6,52 = [HRP] en mg/ml.
- 3) Determinar el número de mM de HRP dividiendo la concentración de proteína en mg/ml (obtenida en 2) por el peso fórmula (40.000) y multiplicando por 1000.
- 25 4) Determinar la contribución del anticuerpo secundario a la absorbancia del conjugado a 280 nm, midiendo la absorbancia del conjugado a 280 nm y restando la contribución de la HRP determinada en 1.
- 5) A partir del valor obtenido en 4 determinar la cantidad del anticuerpo en mg/ml mediante la ecuación: absorbancia del anticuerpo a 280 nm / 14 = [anticuerpo] en mg/ml.
- 6) Determinar el número de mM de anticuerpo dividiendo la concentración de anticuerpo en mg/ml (obtenida en 5) por el peso fórmula (150.000) y multiplicando por 1000.
- 30 7) Calcular el número de HRP por anticuerpo secundario dividiendo los mmoles de HRP (determinados en 3) por el número de mmoles de anticuerpo secundario (determinado en 6).

Determinación del coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1 por ciento del conjugado HRP-anticuerpo

35

El coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1 por ciento (1 mg/ml) del conjugado HRP-anticuerpo se determina midiendo las concentraciones proteicas de conjugado y posteriormente la absorbancia a 280 nm. Las concentraciones de proteína se pueden medir según el ensayo de Pierce Coomassie arriba descrito.

E. Estabilidad de los conjugados en los análisis inmunohistoquímicos

La estabilidad en IHC a 45°C de un cóctel de conjugados de anticuerpo de cabra-anti ratón y de anticuerpo de cabra-anti conejo con HRP se determinó en un diluyente de avidina con bloqueante B5 (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ); los resultados se muestran en la FIG. 1 AD. Se ensayaron cortes tisulares de amígdalas humanas incluidos y fijados en parafina, empleando anticuerpos primarios de CD20/L26 (ratón), seguido de detección con DAB mediante el cóctel de conjugados, conforme a un protocolo estándar automatizado en un aparato Bench-Mark® XT autostainer (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Todos los portaobjetos se prepararon por triplicado. La FIG. 1A muestra los típicos resultados del día 0 del ensayo; la FIG. 1B muestra resultados típicos del día 1 del ensayo; la FIG. 1C muestra resultados típicos del día 3 del ensayo; y la FIG. 1D muestra resultados típicos del día 7 del ensayo. Incluso a la temperatura elevada de 45°C, los conjugados revelados no se degradaron completamente (30-40% de pérdida de intensidad de tinción) al cabo de 7 días, lo cual demuestra que son muy estables.

Se llevaron a cabo estudios similares durante un periodo de almacenamiento más largo, a 2-8°C, a 27°C y a 37°C (no se indica ningún dato), y asimismo se demostró la mayor estabilidad de los conjugados revelados. En resumen, a 2-8°C no se observó ningún cambio en la intensidad de tinción entre el día 0 y la 2ª semana. A 27°C no se observó virtualmente ningún cambio en la intensidad de tinción entre el día 0 y la 2ª semana para el CD20. A 37°C se observó una pérdida del ~ 25% de la intensidad de tinción durante un periodo de una semana y una pérdida del 30-50% de la intensidad de tinción a las dos semanas, tanto para el CD20 como para el PSA. En la semana 2 hay un 30-50% de pérdida de la intensidad de tinción, tanto para el CD20 como para el PSA.

F. Valoración del rendimiento IHC de los conjugados como anticuerpos secundarios de distintos anticuerpos primarios

Se utilizó un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón preparado con el conector MAL-PEG₄-NHS, un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo preparado con el mismo conector o una mezcla de anticuerpo

65

de conejo anti-IgG de ratón con los dos conjugados (“amplificación”), como anticuerpo secundario reactivo para detectar la unión a los antígenos tisulares de los anticuerpos primarios abajo relacionados (que suministra Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Con estos conjugados se trataron cortes tisulares apropiados de archivo y se desarrollaron siguiendo protocolos estándar para la generación de señales detectables mediante HRP (añadiendo DAB) en un aparato Bench-Mark® XT autostainer (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Un típico protocolo automatizado incluye la desparafinación, varias etapas de lavado, la adición de un tampón de reacción, la adición del anticuerpo primario, la adición del anticuerpo secundario, la adición de DAB y peróxido de hidrógeno y una tinción de contraste.

Se tiñeron cortes tisulares comparables (adyacentes) con los conjugados revelados y con conjugados de HRP/F(ab')₂ con andamiaje de polilisina (en lo sucesivo “conjugados con andamiaje”) usados como anticuerpo secundario reactivo. Los conjugados con andamiaje eran de segunda generación (más pequeños y homogéneos según la determinación por cromatografía de exclusión de tamaños) o de primera generación (más grandes e inhomogéneos según la determinación por cromatografía de exclusión de tamaños). Para una descripción más completa de los conjugados con andamiaje véanse las patentes U.S. nº 6,613,564 y 6,252,053.

Anticuerpos

Anti-bcl-2 (clon 100/D5)	Anti-CD57 (clon NK-1)
Anti-CD15 (clon MMA)	Anti-CD23 (clon 1B12)
Anti-CD20 (clon L26)	Anti-ER (clon 6F 11)
Anti-PR (clon 16)	Anti- p53 (clon D07)
Anti-EGFR (clon 31G7)	Anti-ciclina-d1 (clon P2D11F11)
Anti-c-erbB-2 (clon CB11)	Anti-PSA

**nota: todos eran anticuerpos de ratón, excepto el PSA, que es un anticuerpo de conejo.*

La FIG. 2 muestra los resultados de tinción para la detección de bcl-2 mediante el conjugado revelado (FIG. 2A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 2B). Los resultados demuestran que la mayor intensidad de tinción se consigue con el conjugado revelado en cortes tisulares comparables.

La FIG. 3 muestra los resultados de tinción para la detección de CD-15 mediante el conjugado revelado (FIG. 3A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 3B). Los resultados demuestran que la mayor intensidad de tinción se consigue con el conjugado revelado en cortes tisulares comparables.

La FIG. 4 muestra los resultados de tinción para la detección de CD-20 mediante el conjugado revelado (usando amplificación, FIG. 4A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 4B). Los resultados demuestran que la mayor intensidad de tinción se consigue con el conjugado revelado en cortes tisulares comparables.

La FIG. 5 muestra los resultados de tinción para la detección de CD-23 mediante el conjugado revelado (FIG. 5A), el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 5B) y el conjugado con andamiaje de primera generación (FIG. 5C). Los resultados demuestran que, en cortes tisulares comparables, el conjugado revelado proporciona una intensidad de tinción mayor que la observada para ambos conjugados con andamiaje.

La FIG. 6 muestra los resultados de tinción para la detección de CD57 mediante el conjugado revelado (FIG. 6A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 6B). Los resultados demuestran que la mayor intensidad de tinción se consigue con el conjugado revelado en cortes tisulares comparables.

La FIG. 7 muestra los resultados de tinción para la detección de cerb-B2/CB11 mediante el conjugado revelado (FIG. 7A), el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 7B) y el conjugado con andamiaje de primera generación (FIG. 7C). Los resultados demuestran que, en cortes tisulares comparables, el conjugado revelado proporciona una intensidad de tinción mayor que la observada para ambos conjugados con andamiaje.

La FIG. 8 muestra los resultados de tinción para la detección de ciclina-D1 mediante el conjugado revelado (FIG. 8A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 8B). Los resultados demuestran que la mayor intensidad de tinción se consigue con el conjugado revelado en cortes tisulares comparables.

La FIG. 9 muestra los resultados de tinción para la detección de EGFR mediante el conjugado revelado (FIG. 9A), el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 9B) y el conjugado con andamiaje de primera generación (FIG. 9C). Los resultados demuestran que, en cortes tisulares comparables, el conjugado revelado proporciona una intensidad de tinción mayor que la observada para ambos conjugados con andamiaje.

La FIG. 10 muestra los resultados de tinción para la detección de ER mediante el conjugado revelado (FIG. 10A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 10B). Los resultados demuestran que la mayor intensidad de tinción se consigue con el conjugado revelado en cortes tisulares comparables.

La FIG. 11 muestra los resultados de tinción para la detección de p53 mediante el conjugado revelado (FIG. 11A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 11B). Los resultados demuestran que, en cortes tisulares comparables, el conjugado revelado y el conjugado con andamiaje proporcionan una intensidad de tinción similar.

5 La FIG. 12 muestra los resultados de tinción para la detección de PR mediante el conjugado revelado (FIG. 12A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 12B). Los resultados demuestran que la mayor intensidad de tinción se consigue con el conjugado revelado en cortes tisulares comparables.

10 La FIG. 13 muestra los resultados de tinción para la detección de PSA mediante el conjugado revelado (FIG. 13A) y el conjugado con andamiaje de segunda generación (FIG. 13B). Los resultados demuestran que la mayor intensidad de tinción se consigue con el conjugado revelado en cortes tisulares comparables.

15 En conclusión, los resultados de los ensayos de detección en tejidos mediante las composiciones de conjugados revelados demostraron que los conjugados revelados tiñen los tejidos significativamente mejor que los conjugados con andamiaje.

G. Estabilidad de los conjugados a 37°C y a 45°C para la detección metalográfica enzimática de secuencias de ácido nucleico

20 Se realizaron ensayos para valorar la estabilidad a lo largo del tiempo de un conjugado anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-HRP (PEG₄) a 45°C y a 37°C. En este caso la estabilidad de los conjugados se valoró en un ensayo que implica la detección metalográfica enzimática (EnzMet, Nanoprobes Inc., Yaphank, NY) de secuencias de ácido nucleico. Tal como ilustra la FIG. 14, la sonda de ADN marcada con biotina se detectó con una combinación de un conjugado anticuerpo anti-biotina de conejo y un conjugado anticuerpo anti-IgG de conejo. La mezcla de conjugados se conservó en el diluyente Stabilzyme Select (Surmodics, Eden Prairie, MN). La estabilidad del conjugado con andamiaje de segunda generación descrito en el anterior ejemplo D también se examinó durante el mismo periodo de tiempo.

30 La FIG 15A muestra un tejido teñido con el conjugado revelado al día 0, que puede ser comparado con el tejido teñido con el conjugado que lleva andamiaje al día 0 en la FIG. 15B. La FIG. 15C muestra un tejido teñido con el conjugado revelado al día 7, tras 7 días de almacenamiento a 37°C, que puede ser comparado con el tejido teñido con el conjugado que lleva andamiaje al día 7, tras 7 días de almacenamiento a 37°C, en la FIG. 15D. La FIG. 15E muestra un tejido teñido con el conjugado revelado al día 7, tras 7 días de almacenamiento a 45°C, que puede ser comparado con el tejido teñido con el conjugado que lleva andamiaje al día 7, tras 7 días de almacenamiento a 45°C, en la FIG. 15F. La intensidad de tinción mostrada en las figuras demuestra la mayor estabilidad del conjugado revelado, a ambas temperaturas, durante un periodo de 7 días, mientras que el conjugado con andamiaje muestra una pérdida completa de la capacidad de tinción después de 7 días a la temperatura más alta.

40 La estabilidad relativa a lo largo del tiempo del conjugado revelado y del conjugado con andamiaje para detectar copias simples y copias múltiples de una secuencia de ADN diana está representada gráficamente en la FIG. 16A (37°C) y en la FIG. 16B (45°C). Los gráficos ilustran en qué medida el conjugado con andamiaje es menos efectivo para la metalografía enzimática de las dianas, tanto de copias simples como copias múltiples, cómo el conjugado con andamiaje es completamente inefectivo para detectar copias simples, mientras que el conjugado revelado fue efectivo para detectar copias simples, incluso después de muchos días de almacenamiento a temperatura elevada, y cómo el conjugado revelado mantiene a lo largo del tiempo su capacidad para detectar copias múltiples a ambas temperaturas, mientras que el conjugado con andamiaje pierde rápidamente su capacidad para amplificar la señal genética a ambas temperaturas.

H. Efecto de las condiciones de reacción en la composición de los conjugados

50 La reproducibilidad con que se podía preparar un conjugado de anticuerpo-HRP bien definido se estudió mirando el efecto del tiempo de reducción del anticuerpo con DTT, la longitud del conector, así como el tipo y la estequiometría del conector añadido, la concentración de HRP en la reacción de acoplamiento y la relación molar entre la HRP y el anticuerpo. Las comparaciones iniciales se hicieron por cromatografía de exclusión de tamaños en un purificador Akta LC equipado con una columna Superdex 10/300 200 GL (Amersham, Piscataway, NJ). Como fase móvil se usó suero fisiológico tamponado con fosfato a pH = 7,5, a una caudal de 1 ml/min.

Variación del tiempo de reducción con DTT

60 Siguiendo el protocolo de síntesis del conjugado descrito anteriormente en el ejemplo B se programó una serie de reacciones variando el tiempo de incubación con DTT (25 mM). Se hicieron ensayos en los siguientes momentos: a los 15 min, 25 min, 35 min y 60 min. Tras la reacción de acoplamiento entre el anticuerpo y la HRP modificada con maleimida se sacaron los cromatogramas de exclusión de tamaños mostrados en la FIG. 17. Resultó evidente que la variación del tiempo de tratamiento con DTT no alteró notablemente la composición del conjugado. La especificidad o intensidad de la tinción del tejido (de amígdalas, Ki-67) obtenida con estos conjugados no varió significativamente con un tratamiento de 15 min con DTT y solo fue algo mejor que el resto. Por consiguiente, como en los otros tres

momentos se obtiene una tinción idéntica del tejido, este estudio indica que el efecto de la reducción con DTT en función del tiempo no es excesivamente crítico para la producción de un conjugado activo reproducible según los métodos revelados.

5 *Variación de la longitud / tipo de conector*

10 Siguiendo el procedimiento del ejemplo B se programó una serie de reacciones, variando el tipo y el tamaño del conector. Se usaron los siguientes conectores: LC-SMCC (conector hidrófobo de 16 átomos, Pierce, Rockford IL), éster de MAL-dPEG₈-NHS (conector hidrófilo de 34 átomos, Quanta Biodesign, Inc., Powell OH), éster de MAL-dPEG₁₂-NHS (conector hidrófilo de 46 átomos, Quanta Biodesign, Inc., Powell OH), así como el recomendado éster de MAL-dPEG₄-NHS (conector hidrófilo de 22 átomos, Quanta Biodesign, Inc., Powell OH). Cada uno de estos conectores se usó cien veces en exceso durante 1 hora en un tampón (fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5). El LC-SMCC se disolvió en dimetilformamida (DMF) y se añadió a la HRP, pero sin exceder un 10% del volumen total de DMF en el tampón. Después del acoplamiento al anticuerpo tratado con DTT se obtuvieron cromatogramas de exclusión de tamaños (FIG. 18) tras la purificación. Basándose el volumen de retención, cada uno de los tres conectores de PEG dio un rendimiento comparativamente bueno, mientras que el conector de LC-SMCC produjo una menor conjugación con la HRP (pico más grande a ~16 min) y un conjugado generalmente más pequeño.

20 Las diferencias en la intensidad de tinción inmunohistoquímica de tejidos (conjugado anticuerpo primario de Ki-67/ anticuerpo secundario con amplificación, en tejido de amígdalas) alcanzada por los distintos conjugados fueron claras (FIG. 19); el conjugado de LC-SMCC produjo la tinción más ligera. Cada uno de los ciclos de tinción se realizó para absorbancias equivalentes de los conjugados a 280 nm ($A_{280} = 0,075$), a fin de poder comparar directamente los datos. Sorprendentemente los tres conjugados derivados de PEG dieron mejor rendimiento que el LC-SMCC (FIG. 19A) y hubo diferencias en la intensidad de tinción alcanzada por cada uno de ellos. En las figuras se aprecia que el PEG₁₂ (FIG. 19D) produjo en general la tinción más oscura, seguido del PEG₈ (FIG. 19C) y luego del PEG₄ (FIG. 19D). Tal como se explica más adelante en relación con los ensayos de hibridación in situ, la tinción intensa obtenida mediante los conjugados preparados con conectores más largos puede eliminar sorprendentemente la necesidad de etapas de amplificación durante la tinción.

30 *Variación de la estequiometría del conector*

La síntesis del conjugado HRP-IgG se realizó siguiendo el procedimiento de conjugación del ejemplo B, pero el exceso molar del conector de éster de MAL-PEG₄-NHS sobre la cantidad de HRP se varió desde cinco veces hasta quinientas veces. El análisis de los conjugados (500x, 250x, 100x, 50x, 25x, 10x y 5x) después de la reacción con el anticuerpo reducido con DTT - efectuado mediante cromatografía de exclusión de tamaños tal como se ha descrito inmediatamente arriba en este ejemplo - indicó que los conjugados sintetizados con un mayor exceso de conector tenían un rango de distribución de tamaños menor y más estrecho (FIG. 20). Sin embargo no pareció haber una gran diferencia en la distribución general de tamaños entre los conjugados de 5x hasta 100x. La tinción de los tejidos (de amígdalas, Ki-67, no representada) para cada uno de estos conjugados fue aproximadamente equivalente; solo la de los de 5x fue algo más oscura que la de las demás proporciones.

Variación de la concentración de HRP en la reacción de acoplamiento del conector

45 Siguiendo el método de síntesis descrito anteriormente en el ejemplo B se investigó el efecto de la concentración de HRP en la etapa inicial de derivatización. En las reacciones se emplearon soluciones madre de HRP a las siguientes concentraciones: 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml y 50 mg/ml, además de la concentración del protocolo original (25 mg/ml). Tras la etapa de acoplamiento con el anticuerpo reducido con DTT no hubo ninguna diferencia en los cromatogramas globales de exclusión de tamaños de los conjugados sintetizados (FIG. 21). Al ensayar la actividad de los conjugados sintetizados sobre el tejido (de amígdalas, Ki-67), se observó que la especificidad y la intensidad de la tinción eran idénticas para los conjugados sintetizados mediante el uso de concentraciones de HRP iguales a 5, 10, 15, 20 y 25 mg/ml. No obstante, la intensidad de la tinción disminuyó al aumentar la concentración inicial de HRP hasta 50 mg/ml. Se concluye que la concentración inicial de HRP debería ser de 10-25 mg/ml para la ampliación del nivel de producción.

55 *Variación de las relaciones molares HRP / Ab*

60 Los conjugados HRP / IgG se sintetizaron aplicando el protocolo descrito en el ejemplo B, pero variando la relación entre el anticuerpo reducido con DTT y la HRP modificada con maleimida. Se ensayaron las siguientes relaciones (anticuerpo / HRP): 3:1, 1:3, 1:2, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, así como la relación 1:3 recomendada. Los perfiles de los cromatogramas de exclusión de tamaños (FIG. 22) indican que al aumentar la cantidad relativa de HRP también lo hace el tamaño global del conjugado, de tal manera que la relación 1:20 (Ab:HRP) genera el conjugado más grande y la relación 3:1 (Ab:HRP) el conjugado más pequeño. Cada uno de estos conjugados dio un buen rendimiento en el tejido (de amígdalas, Ki-67), siendo la relación 3:1 (Ab:HRP) la que produce la tinción más ligera. La relación 1:3 (Ab:HRP) es un punto medio con buena tinción y da unos rendimientos relativamente elevados respecto a la HRP.

65

I. Preparación de un conjugado de anticuerpo de conejo anti-biotina-HRP-PEG₁₂ y su uso para la hibridación metalográfica enzimática in situ

HRP-PEG₁₂-maleimida (4): en un vial ámbar de 4 ml se introdujeron 18,4 mg (100 eq.) de éster MAL-dPEG₁₂[®] NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH, peso fórmula = 865,92) y luego 341 μ l (8,52 mg, 0,213 mM) de HRP (peroxidasa de rábano picante, Pierce, Rockford, IL) en forma de una solución de 25 mg / ml de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5. Luego el vial se puso en un girador automático, en la oscuridad, a la temperatura ambiente (23 – 25°C) y la reacción de formación del enlace amida se dejó proceder durante 1 hora. Después se tomó un alícuota de 340 μ l para purificar. (La capacidad del bucle de inyección del aparato Akta Purifier empleado fue de 500 μ l). Luego se obtuvo HRP-PEG₁₂-maleimida pura fraccionando la muestra en un aparato Akta Purifier equipado con una columna Superdex 10/300 eluida con 1,0 ml / min de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5. Las fracciones que contenían HRP (F15-17) se reunieron para dar 1,5 ml de una solución de 4,75 mg / ml de HRP-PEG₁₂-maleimida (83,6% de recuperación) según la medición en un espectrofotómetro UV/VIS, usando el coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1% de pH 7,5, igual a 6,52.

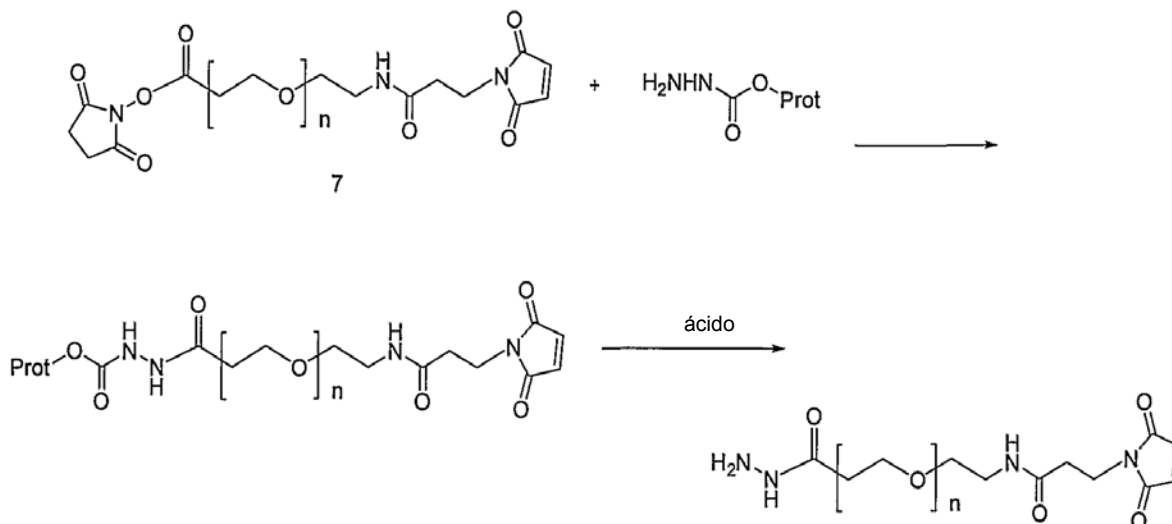
Anticuerpo de conejo anti-biotina tiol (5): en un vial ámbar de 4 ml se introdujeron 2,0 ml de una solución de 1,0 mg/ml de anticuerpo de conejo anti-biotina (Bethyl, Montgomery, TX). A esta solución se le añadieron luego 105,2 μ l de una solución 500 mM del agente reductor DTT (1,4-ditiotreitol) recién preparada. El vial se puso en un girador automático en la oscuridad y la reacción de reducción del disulfuro se dejó proceder durante 25 minutos. La solución se dividió en dos volúmenes iguales (debido a la limitada capacidad de las columnas de desalinización) y el exceso de DTT se eliminó pasando cada una de las fracciones a través de una columna de desalinización PD-10 eluida con fosfato sódico 0,1 M, EDTA 1,0 mM, pH 6,5. Las fracciones que contenían anticuerpo (F4-5) se reunieron para obtener 4,0 ml de una solución de 0,436 mg / ml de anticuerpo de conejo anti-biotina-SH libre de DTT (87,5% de recuperación) según la medición en un espectrofotómetro UV/VIS de Agilent, usando un coeficiente de extinción a 280 nm de una solución al 1% de pH 6,5, igual a 14.

Conjugación HRP-anticuerpo (6): al anticuerpo de conejo anti-biotina-IgG-tiol (5) se le añadió un exceso tres veces molar de HRP-PEG₁₂-maleimida (4). Luego la reacción se incubó a temperatura ambiente (23 – 25°C) por la noche. Después de purificarlo a través de una columna Superdex 200 10/300 GL SE se obtuvieron 875 mg de conjugado con un PM medio de 359 kD.

El procedimiento metalográfico enzimático descrito en el ejemplo G se repitió usando el conjugado de PEG₁₂ anti-biotina como anticuerpo primario (es decir sin amplificación) y sorprendentemente se obtuvo una tinción intensa, aunque no se empleó ninguna amplificación. Estos resultados demuestran que el empleo de conectores largos de PEG heterobifuncionales (PEG₈ o superior, por ejemplo PEG₁₂ o superior) para preparar los conjugados revelados elimina sorprendentemente la necesidad de esquemas de amplificación para las aplicaciones de IHC y ISH en los cortes tisulares.

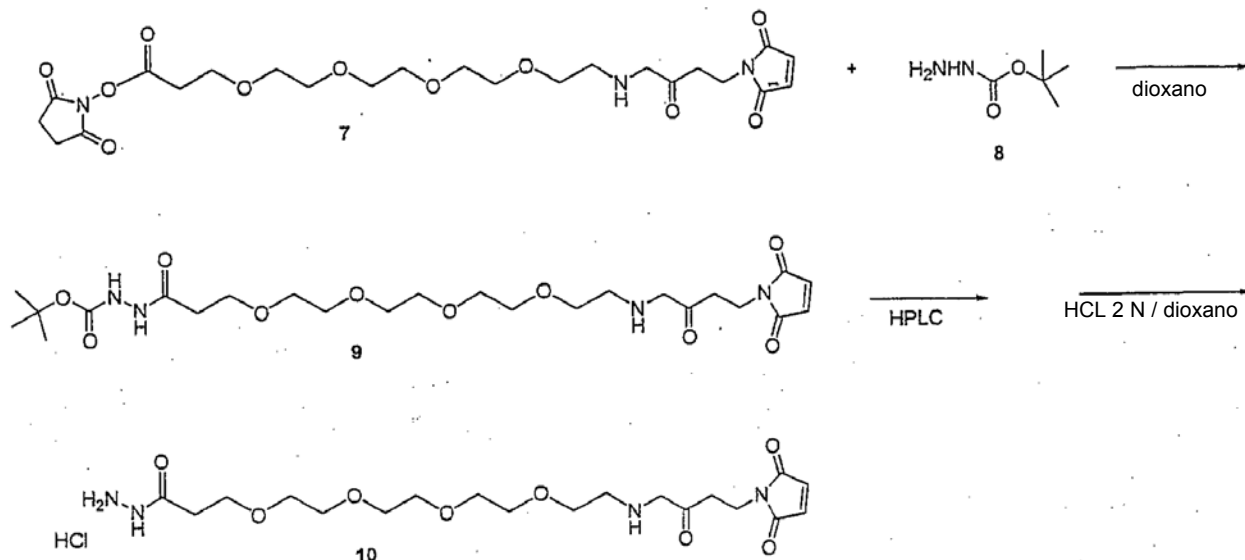
J. Síntesis del conector de maleimida/hidrazida PEG (ejemplo de referencia)

El esquema 6 muestra un método general de preparación de conectores heterobifuncionales de maleimida/hidrazida PEG. En resumen, un conector de maleimida/éster activo de PEG (como el adquirido de Quanta Biodesign) se hace reaccionar con un derivado de hidrazina protegido y después con ácido, para dar el conector de maleimida/hidrazida PEG.



Esquema 6

En el siguiente esquema 7 se esboza una síntesis específica de un conector de maleimida/hidrazida PEG₄. Al éster activo 7 (116 mg, 1,0 eq.) en 5 ml de dioxano seco se agregaron 30 mg (1.0 eq.) de la hidrazina protegida con Boc 8 en 5 ml de dioxano seco a lo largo de 1 hora. Luego la reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno seco durante 16 horas. La mezcla reactiva se fraccionó por HPLC utilizando un aparato Waters Delta 600 HPLC equipado con un detector de fotiodos en serie 2996 y una columna Phenomenex luna 10 μ, C18(2), 100A, 250 x 30 mm. La columna se eluyó con 30-60% de ACN / agua a lo largo de 30 minutos, a un caudal de 12 ml / min. La deseada PEG₄-maleimida protegida con Boc 9 se eluyó a los 38 minutos, dando 50 mg de un aceite amarillo espeso después de secar a vacío elevado. La hidrazida final desprotegida 10 se obtuvo luego agitando el residuo con 6 ml de HCL anhidro 2 N / dioxano en atmósfera de nitrógeno seco durante 45 minutos. Luego por evaporación rotativa se obtuvieron 55 mg de la sal de HCL de la hidrazida-PEG₄-maleimida.

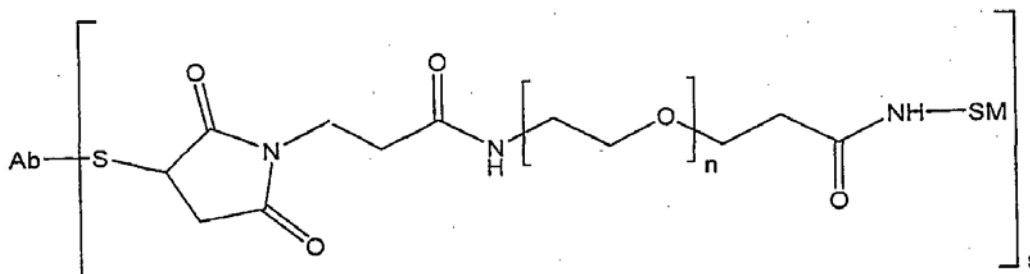


15

Esquema 7

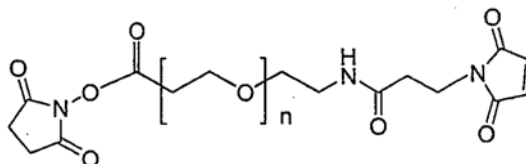
REIVINDICACIONES

1. Conjugado de anticuerpo-resto generador de señal que comprende un anticuerpo unido covalentemente a un resto generador de señal mediante un conector de PEG heterobifuncional, donde el conjugado tiene la fórmula general:



donde Ab es un anticuerpo, SM es un resto generador de señal que lleva un enzima o un punto cuántico, n = 4 a 12 y s = 1 hasta 10.

2. El conjugado de la reivindicación 1 cuyo conector, antes de la conjugación, tiene la fórmula:

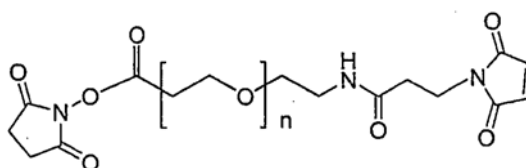


donde n = 4 hasta 12.

3. El conjugado de la reivindicación 1, en el cual el enzima comprende peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina.

4. El conjugado de la reivindicación 1, en el cual s = 2 hasta 6.

5. Método para preparar un conjugado de anticuerpo-resto generador de señal, que consiste en:
hacer reaccionar un anticuerpo con un agente reductor para formar un anticuerpo tiolado;
hacer reaccionar un resto generador de señal que tiene un grupo amino con un conector bifuncional de éster activo de PEG maleimida de fórmula:



donde n = 4 hasta 12; y
hacer reaccionar el anticuerpo tiolado con el resto generador de señal activado para formar el conjugado del anticuerpo y el resto generador de señal,
donde el resto generador de señal comprende un enzima o un punto cuántico.

6. El método de la reivindicación 5, en el cual la reacción del anticuerpo con un agente reductor para formar un anticuerpo tiolado incluye la formación de un anticuerpo con un número medio de tioles por anticuerpo comprendido entre 1 y 10 aproximadamente.

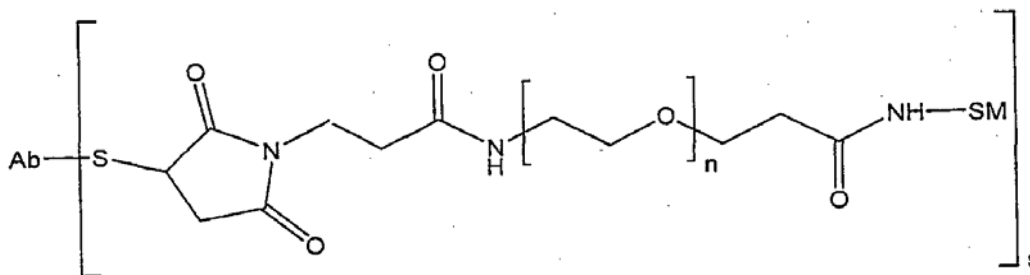
7. El método de la reivindicación 5, en el cual la reacción del anticuerpo con un agente reductor consiste en hacer reaccionar el anticuerpo con un agente reductor seleccionado del grupo constituido por 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina, DTT, DTE y TCEP, y combinaciones de ellos.

8. El método de la reivindicación 7, en el cual la reacción del anticuerpo con un agente reductor consiste en hacer reaccionar el anticuerpo con un agente reductor elegido del grupo formado por DTT y DTE, y combinaciones de ellos.

9. El método de la reivindicación 8, en el cual la reacción del anticuerpo con un agente reductor consiste en hacer reaccionar el anticuerpo con el agente reductor a una concentración comprendida entre 1 mM y 10 mM aproximadamente.

5 10. El método de la reivindicación 5, en el cual el enzima comprende peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina.

11. Método para detectar una molécula de interés en una muestra biológica, el cual consiste en:
 10 poner en contacto la muestra biológica con un conjugado anticuerpo-resto generador de señal que comprende un anticuerpo unido covalentemente a un resto generador de señal mediante un conector de PEG heterobifuncional, donde el conjugado tiene la fórmula general:



15 donde Ab es un anticuerpo, SM es un resto generador de señal que lleva un enzima o un punto cuántico, $n = 4$ a 12 y $s = 1$ hasta 10 , y detectar una señal generada por el conjugado de anticuerpo-resto generador de señal, que indica la presencia de la molécula de interés en la muestra.

20 12. El método de la reivindicación 11, en el cual la muestra biológica comprende un corte de tejido o una muestra citológica.

13. El método de la reivindicación 11, en el cual el enzima comprende peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina.

25 14. El método de la reivindicación 11, que además comprende la puesta en contacto de la muestra biológica con un metal soluble en agua y un substrato redox inactivo del enzima que es convertido en agente redox activo por el enzima, con lo cual el agente redox activo reduce el ion metálico haciéndolo precipitar.

30 15. El método de la reivindicación 14, en el cual el enzima comprende fosfatasa alcalina.

16. El método de la reivindicación 11, en el cual el resto generador de señal incluye un enzima óxido-reductasa y el método consiste asimismo en poner en contacto la muestra biológica con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor.

35 17. El método de la reivindicación 16, en el cual el enzima óxido-reductasa comprende peroxidasa de rábano picante.

40 18. El método de la reivindicación 11, en el cual el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-anticuerpo.

19. El método de la reivindicación 11, en el cual el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-hapteno y el método consiste asimismo en poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo marcado con hapteno o con una secuencia de ácido nucleico marcada con hapteno.

45 20. El método de la reivindicación 11, en el cual el resto generador de señal incluye un enzima y el método consiste asimismo en poner en contacto la muestra biológica con un compuesto cromógeno, fluorógeno y/o luminógeno.



FIG. 1A

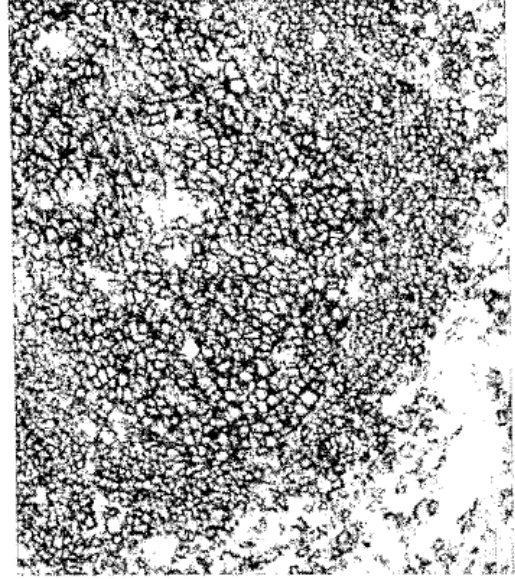


FIG. 1B



FIG. 1C

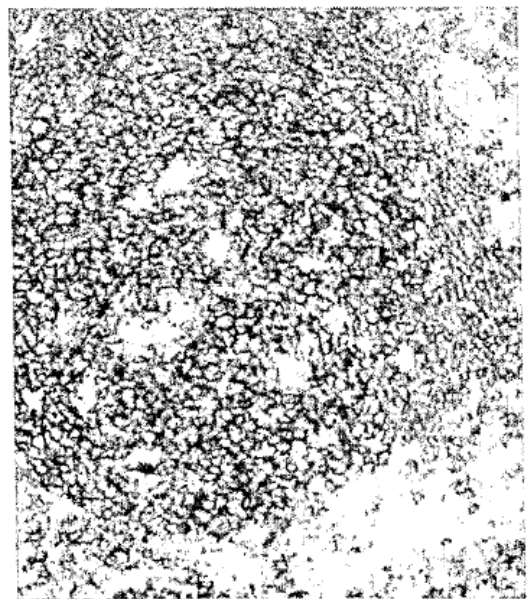


FIG. 1D

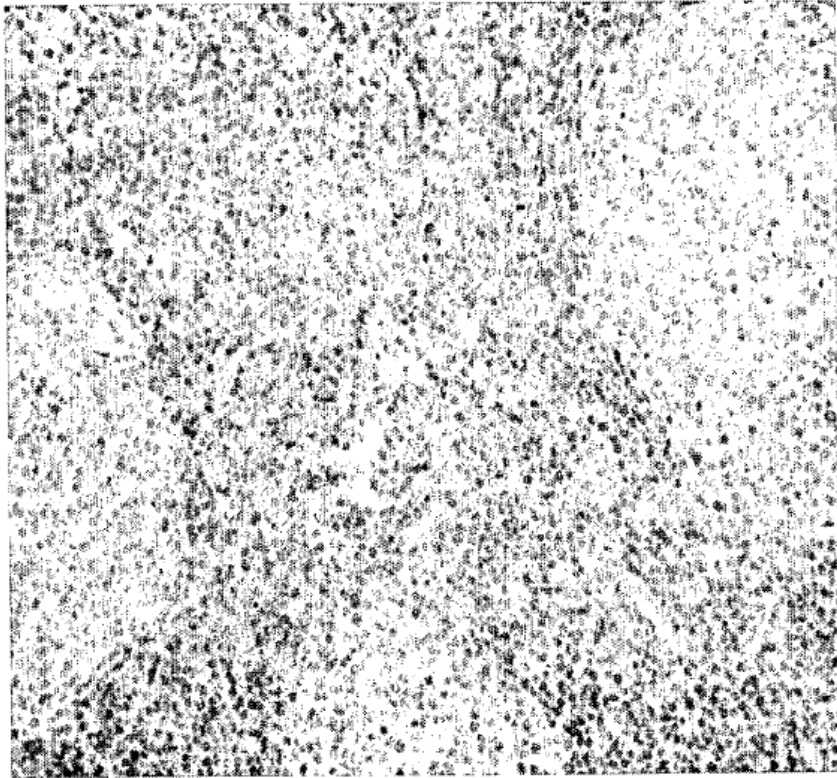


FIG. 2A

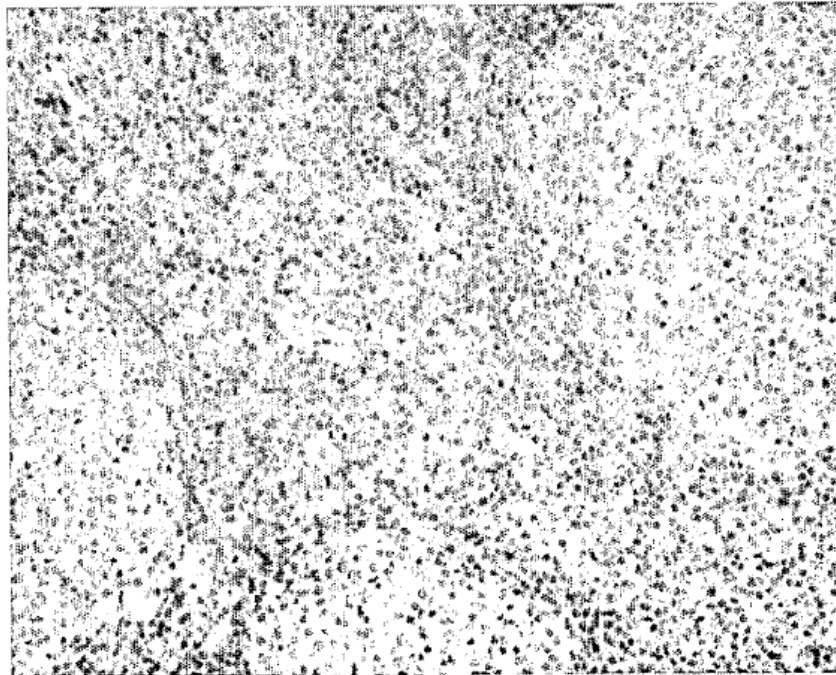


FIG. 2B

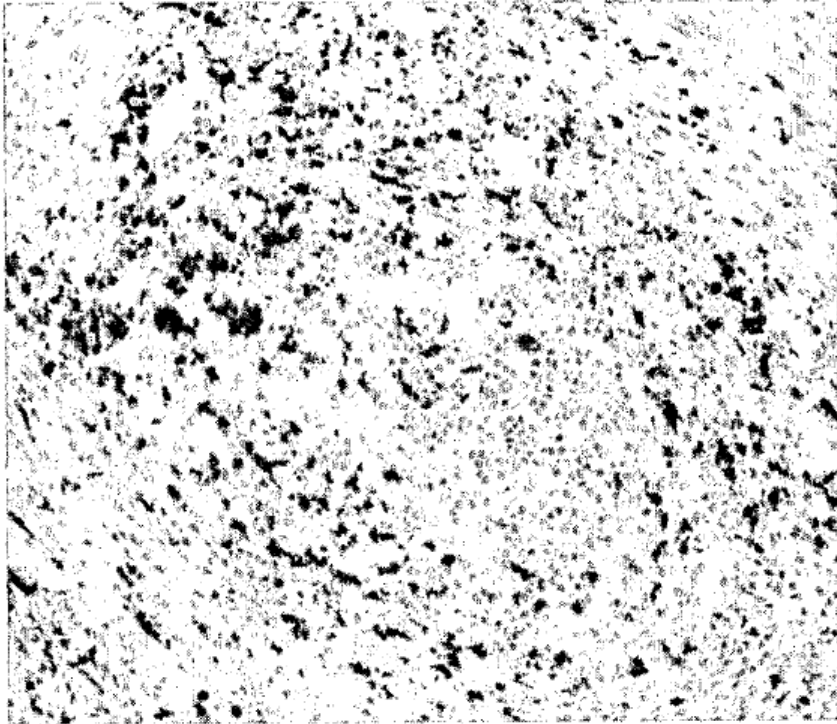


FIG. 3A

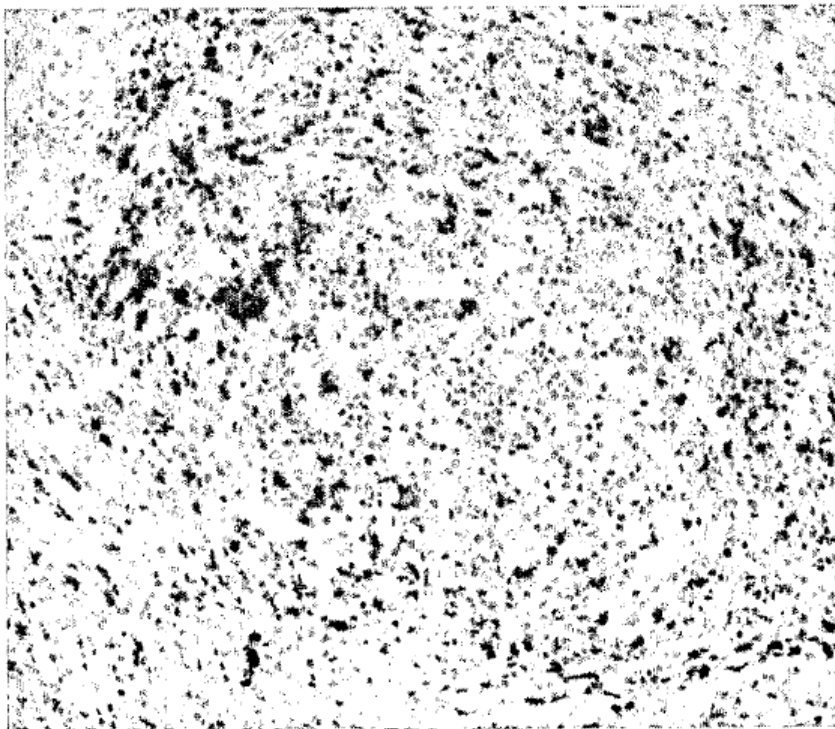


FIG. 3B

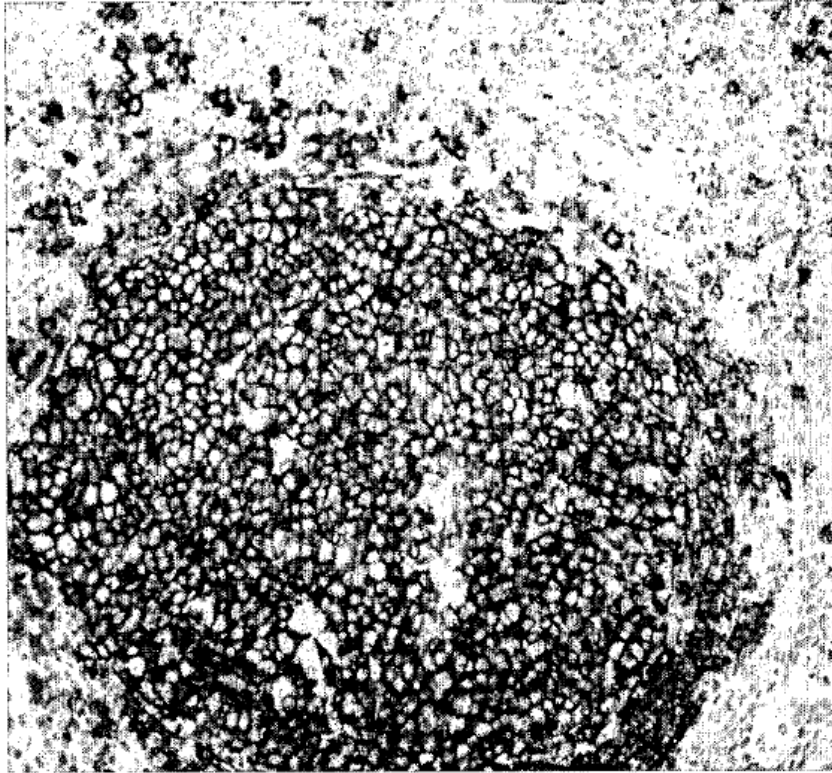


FIG. 4A

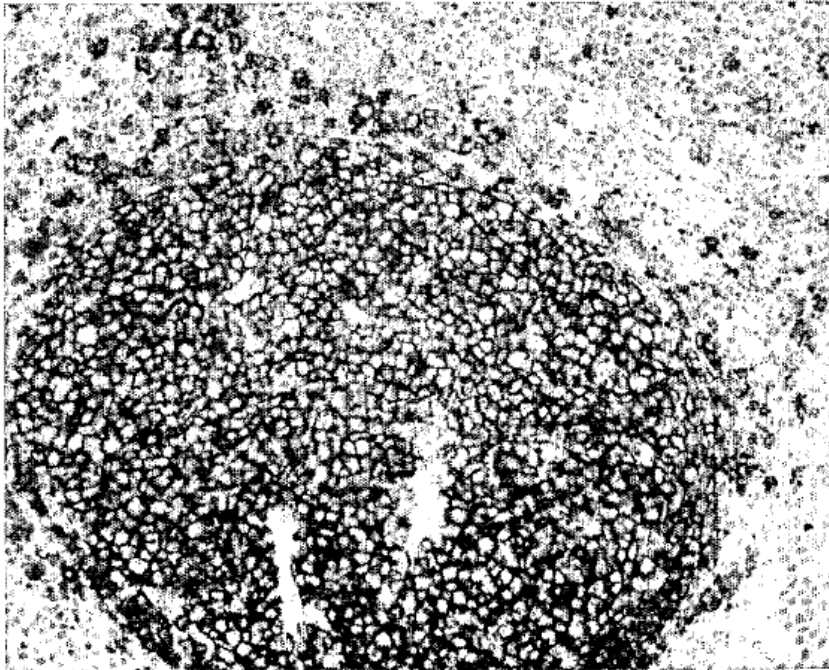


FIG. 4B

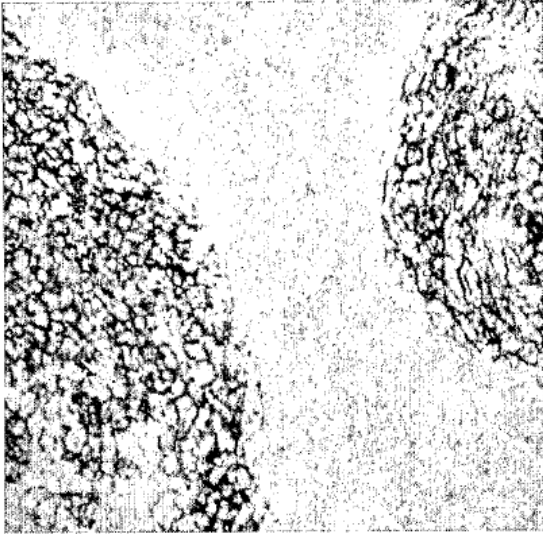


FIG. 5A

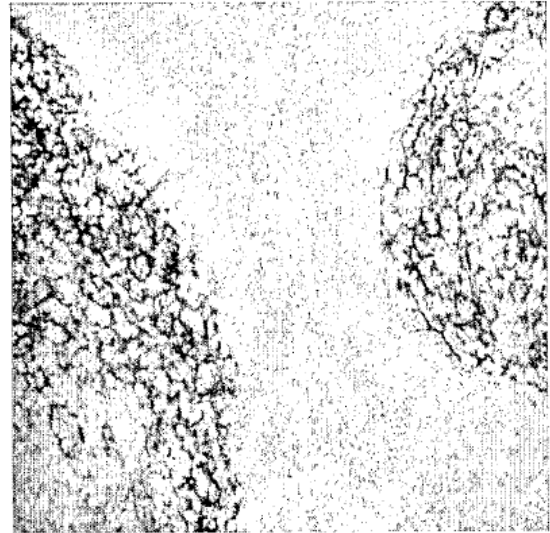


FIG. 5B

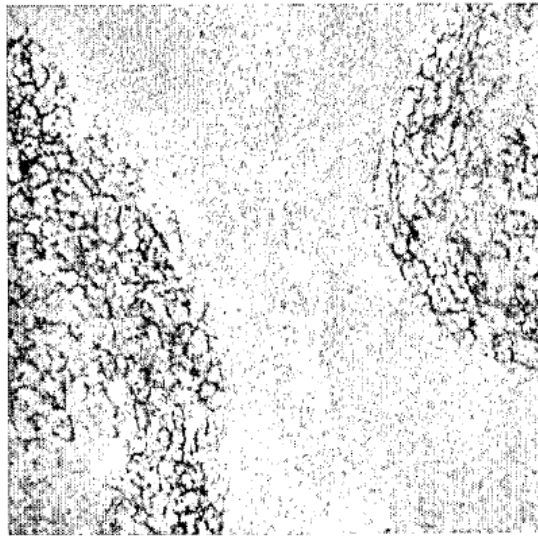


FIG. 5C

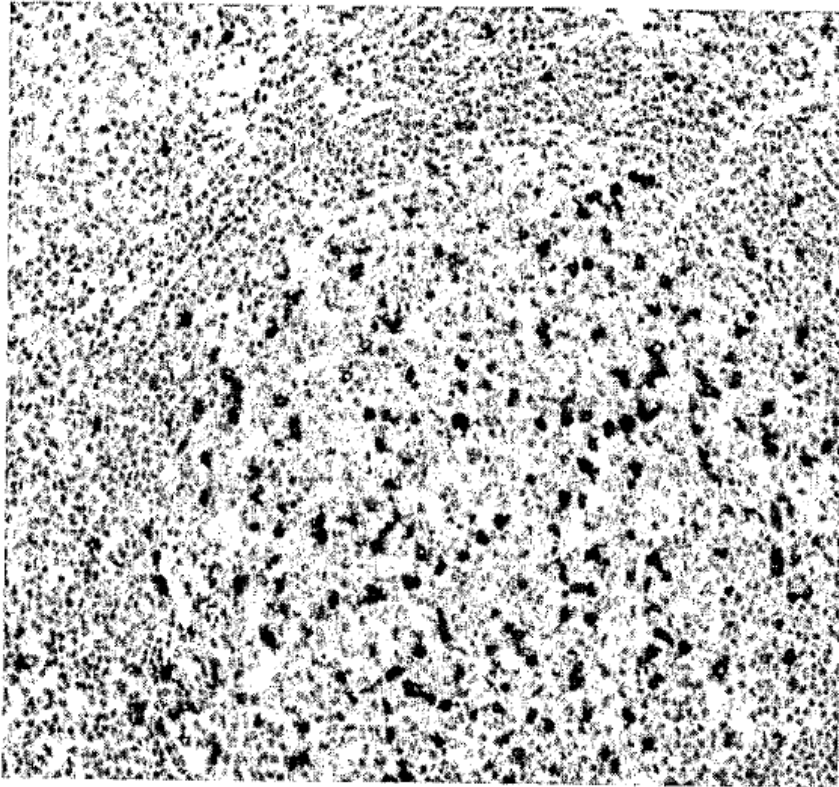


FIG. 6A

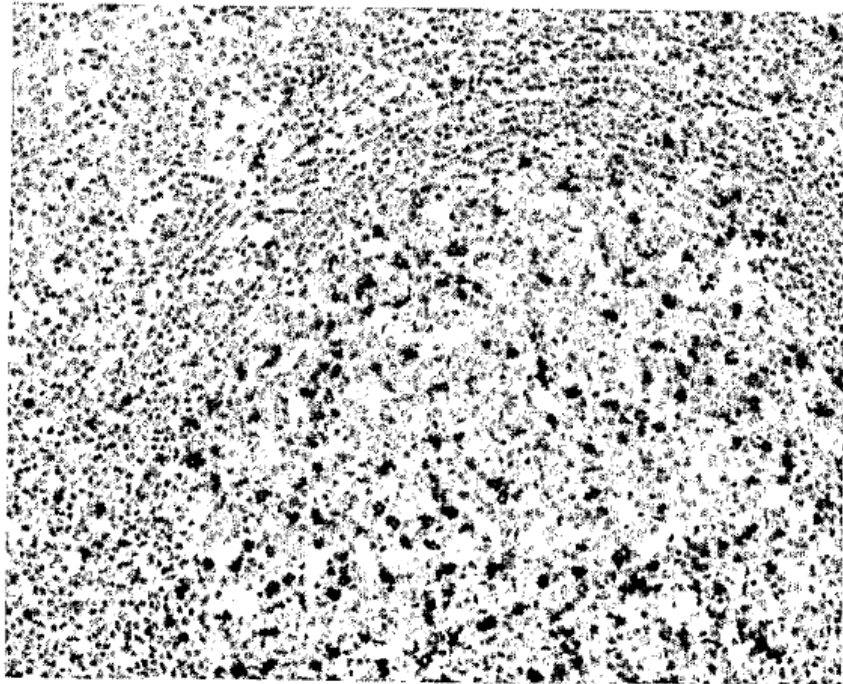


FIG. 6B

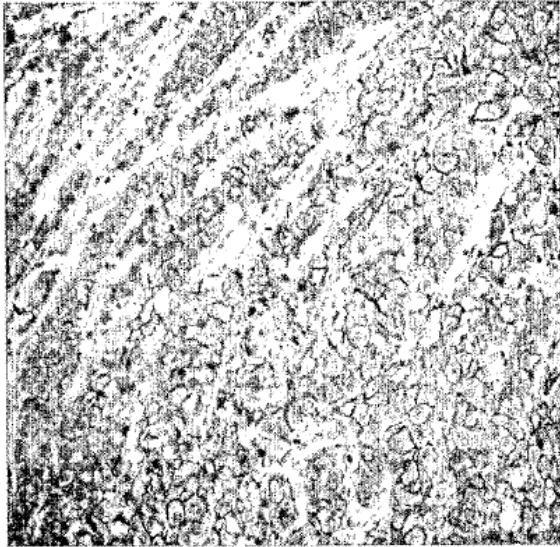


FIG. 7A



FIG. 7B

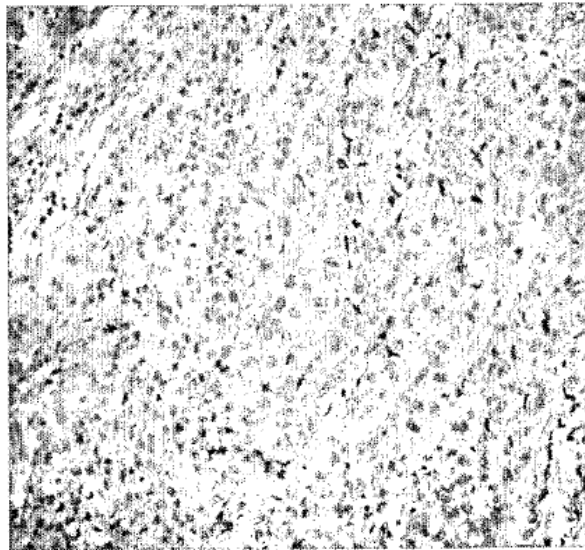


FIG. 7C

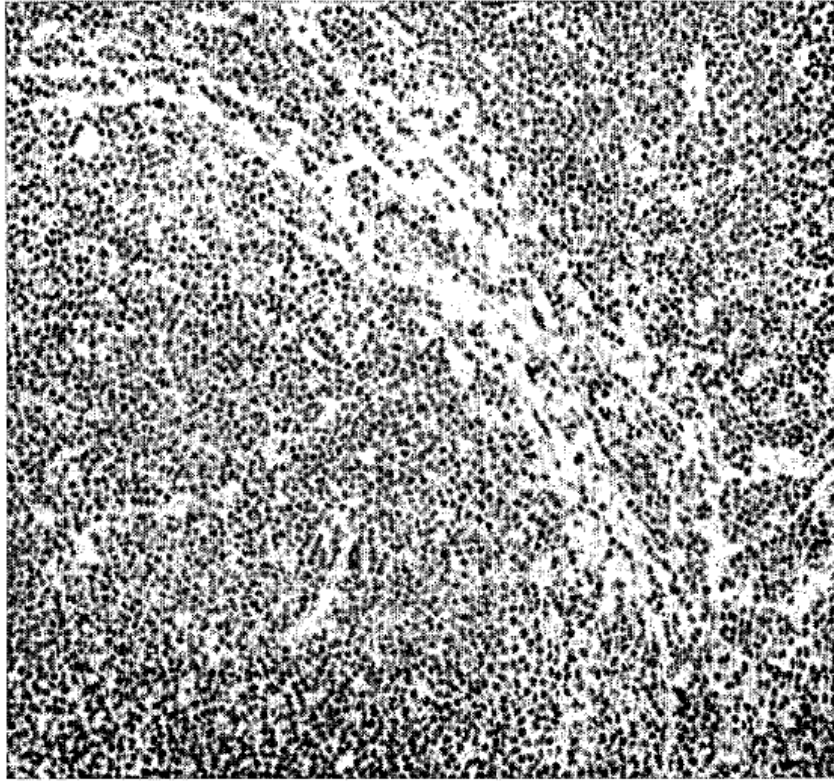


FIG. 8A

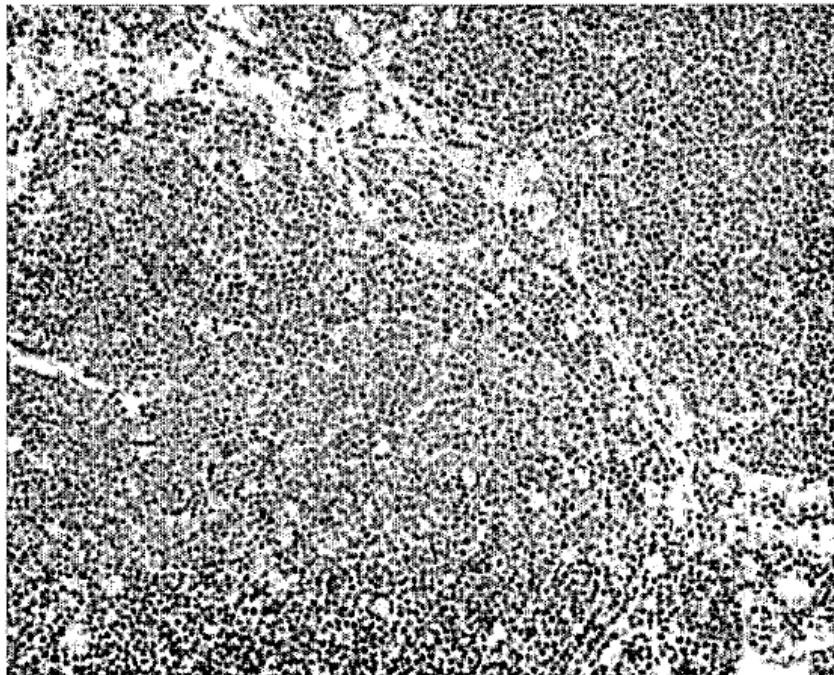


FIG. 8B

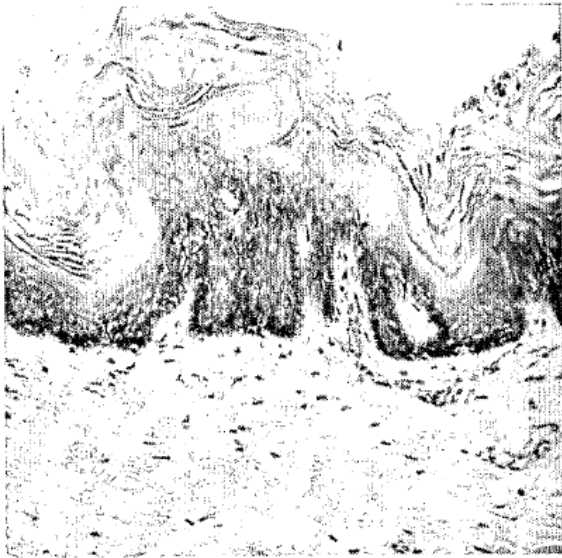


FIG. 9A



FIG. 9B

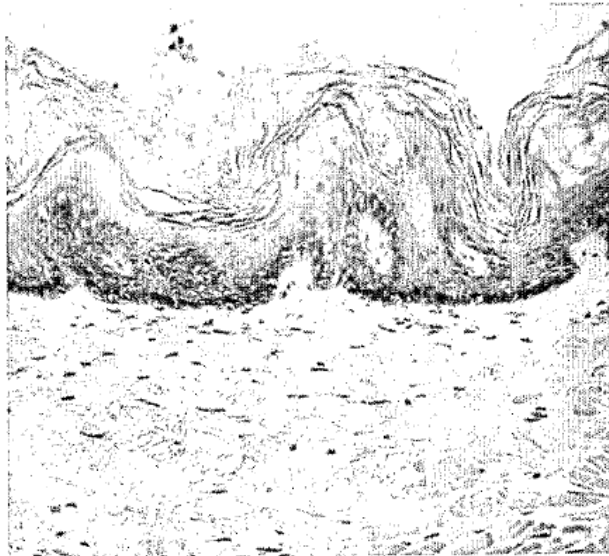


FIG. 9C

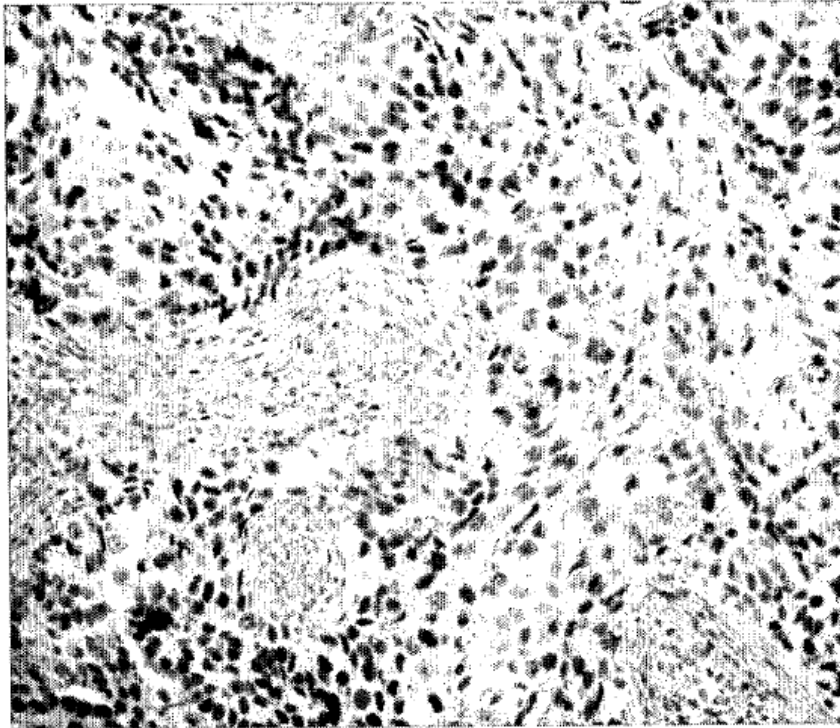


FIG. 10A

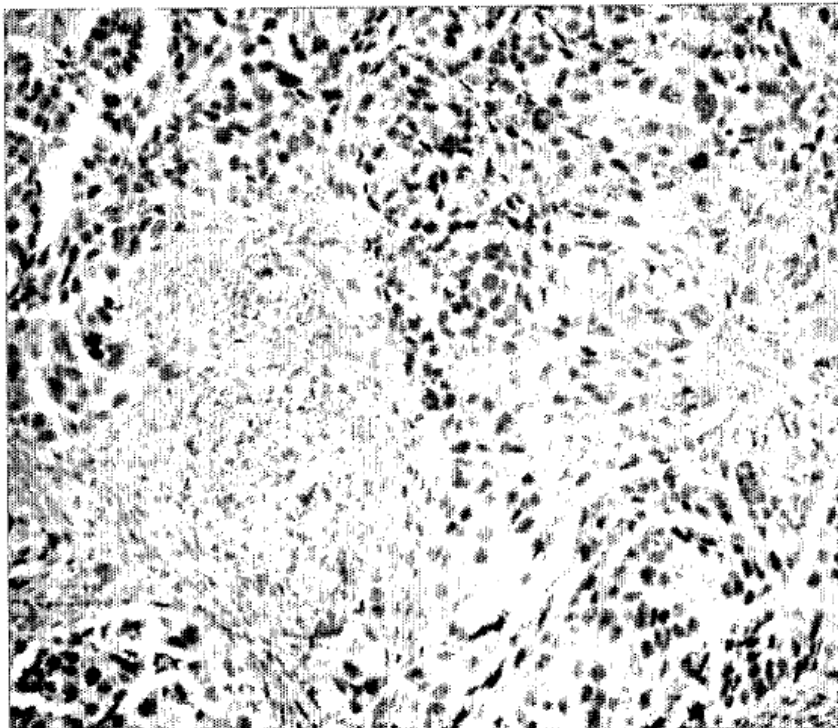


FIG. 10B

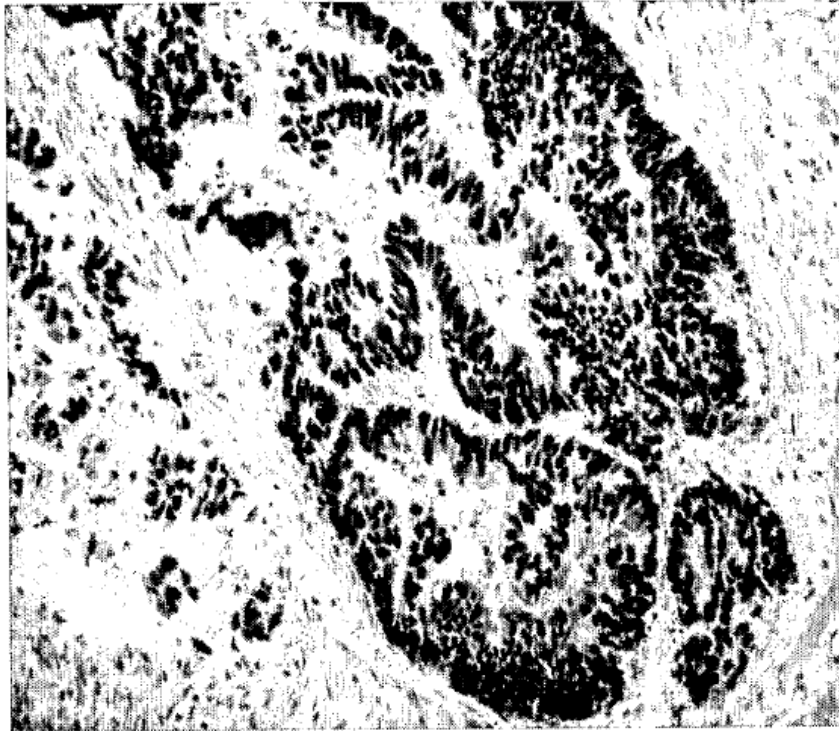


FIG. 11A

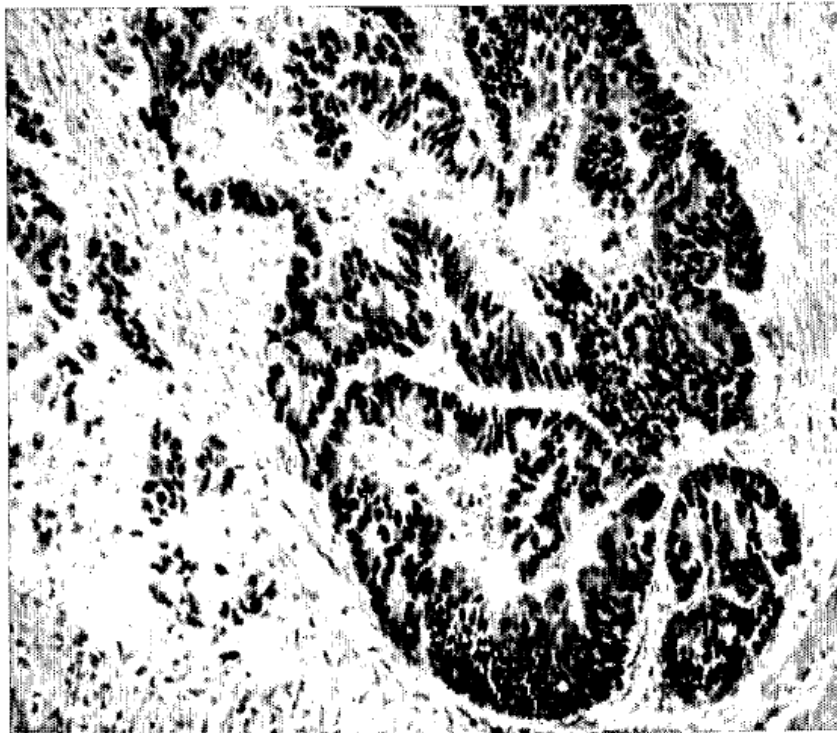


FIG. 11B

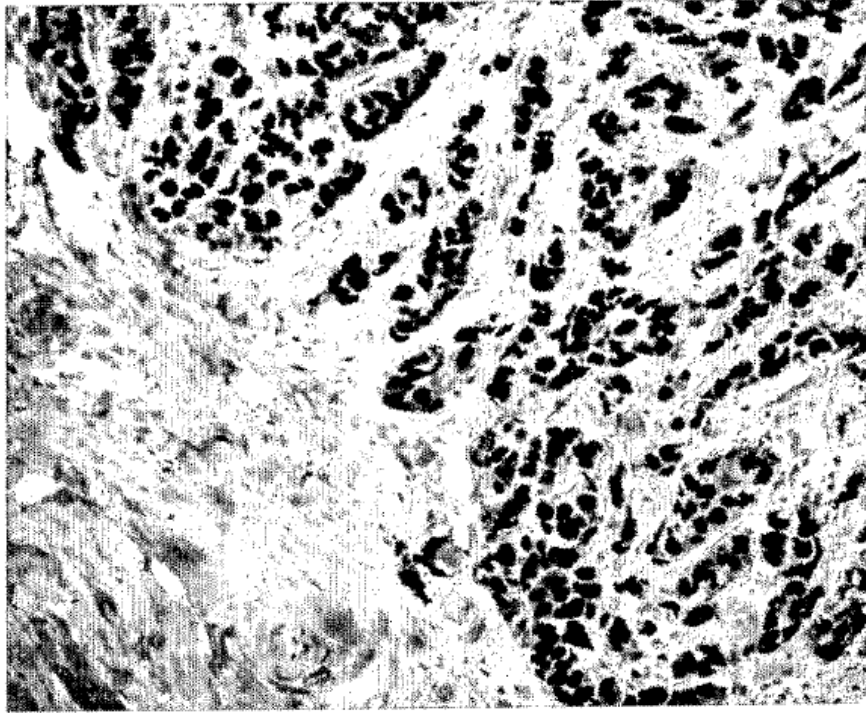


FIG. 12A

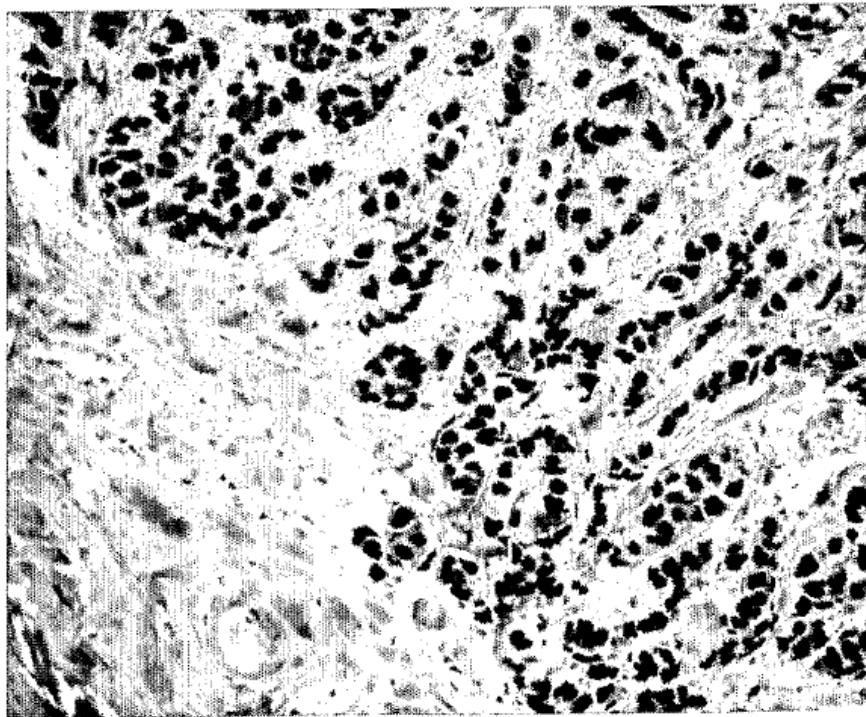


FIG. 12B

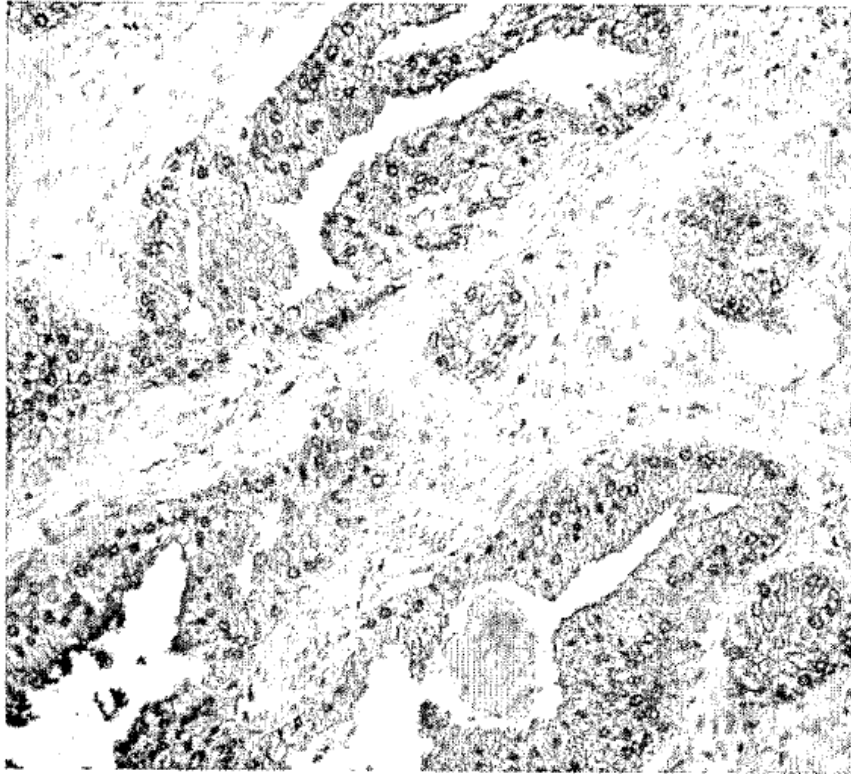


FIG. 13A

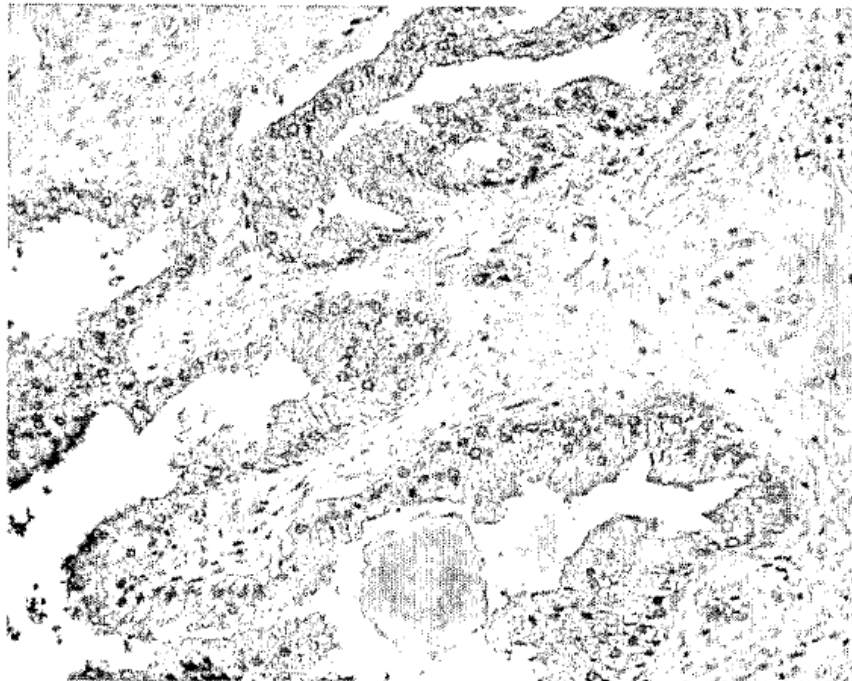


FIG. 13B

Nanosondas EnzMet

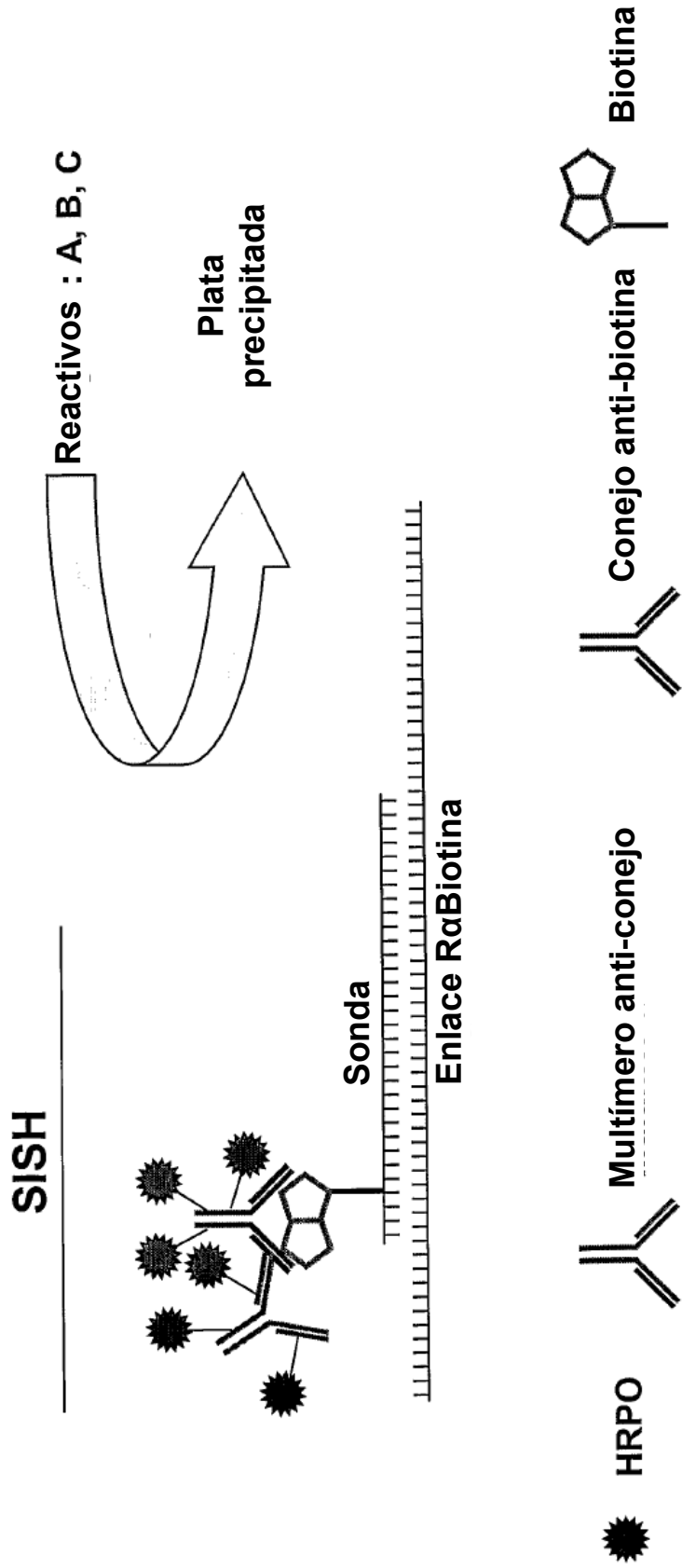


FIG. 14



FIG. 15A

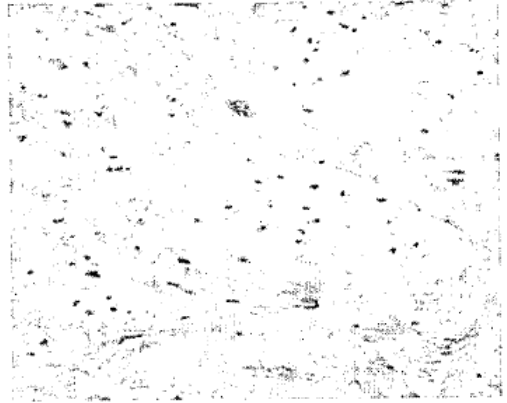


FIG. 15B

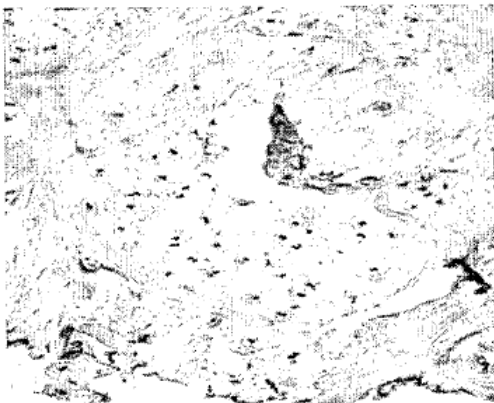


FIG. 15C

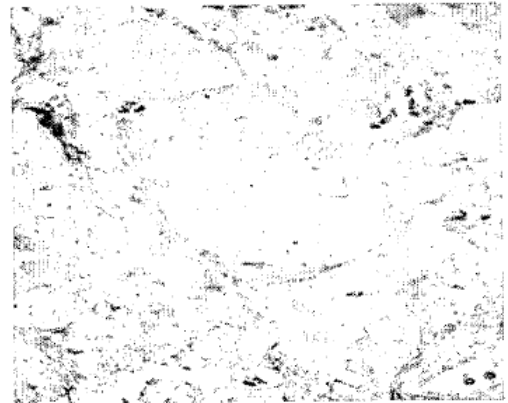


FIG. 15D

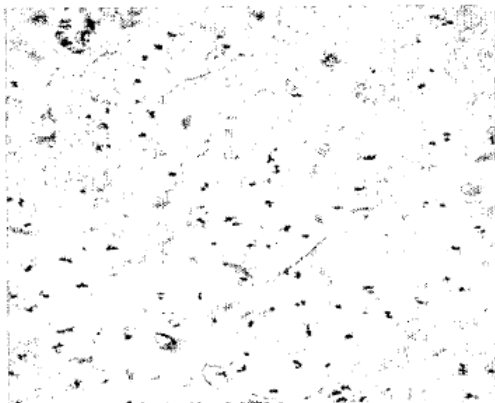


FIG. 15E

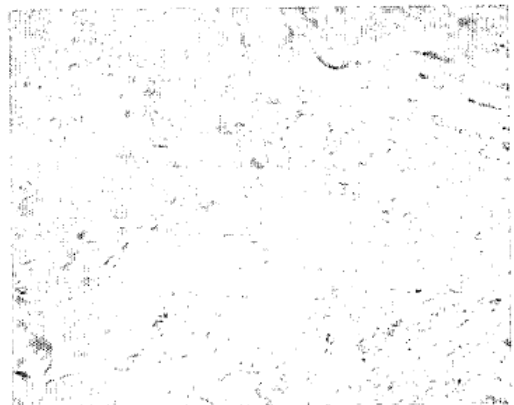


FIG. 15F

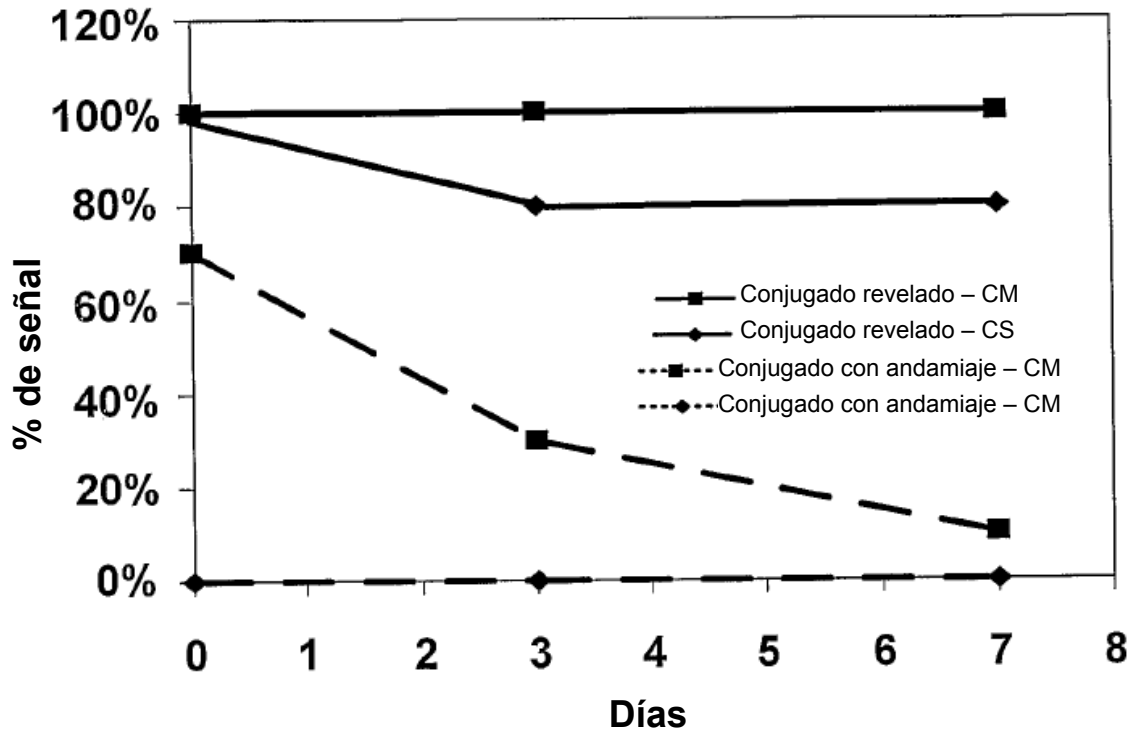


FIG. 16A

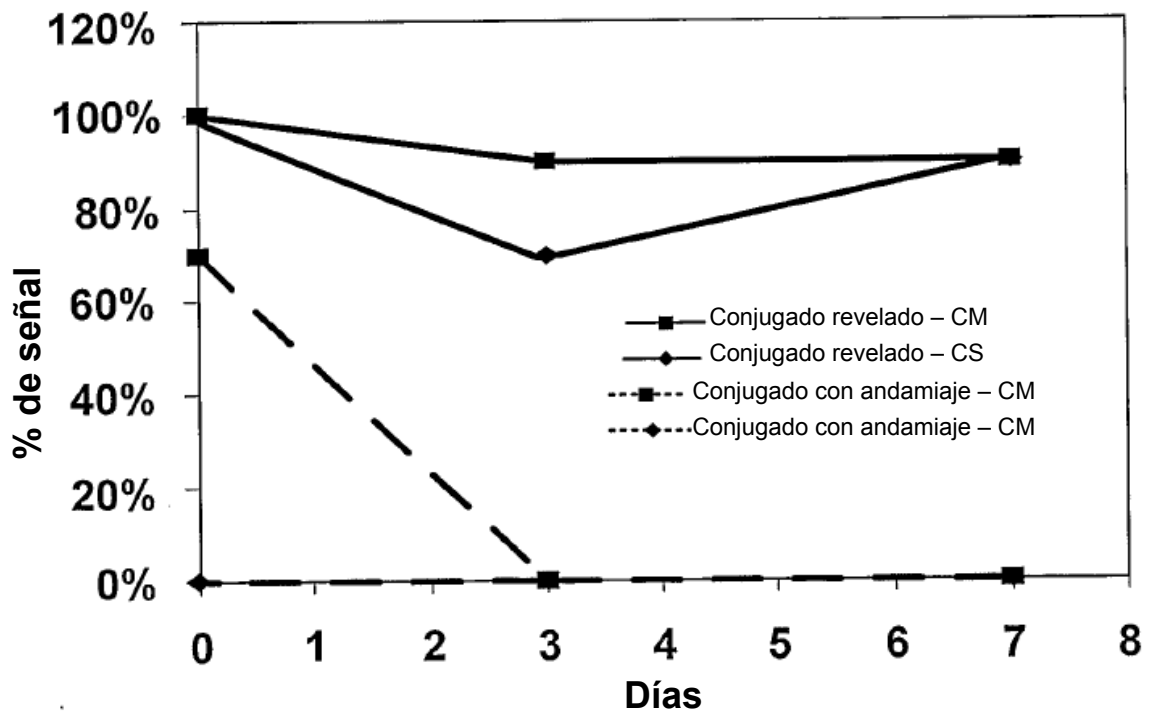


FIG. 16B

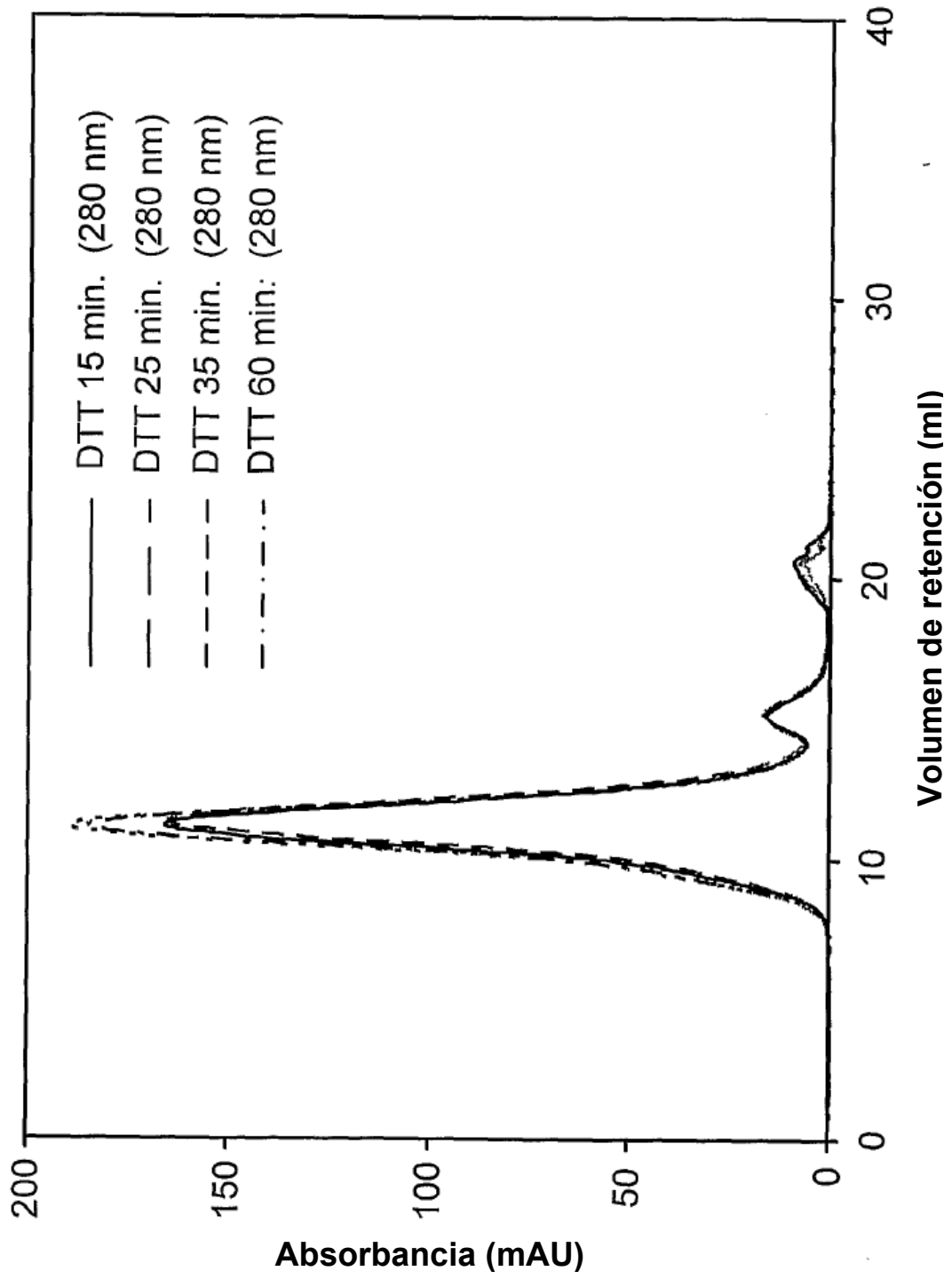


FIG. 17

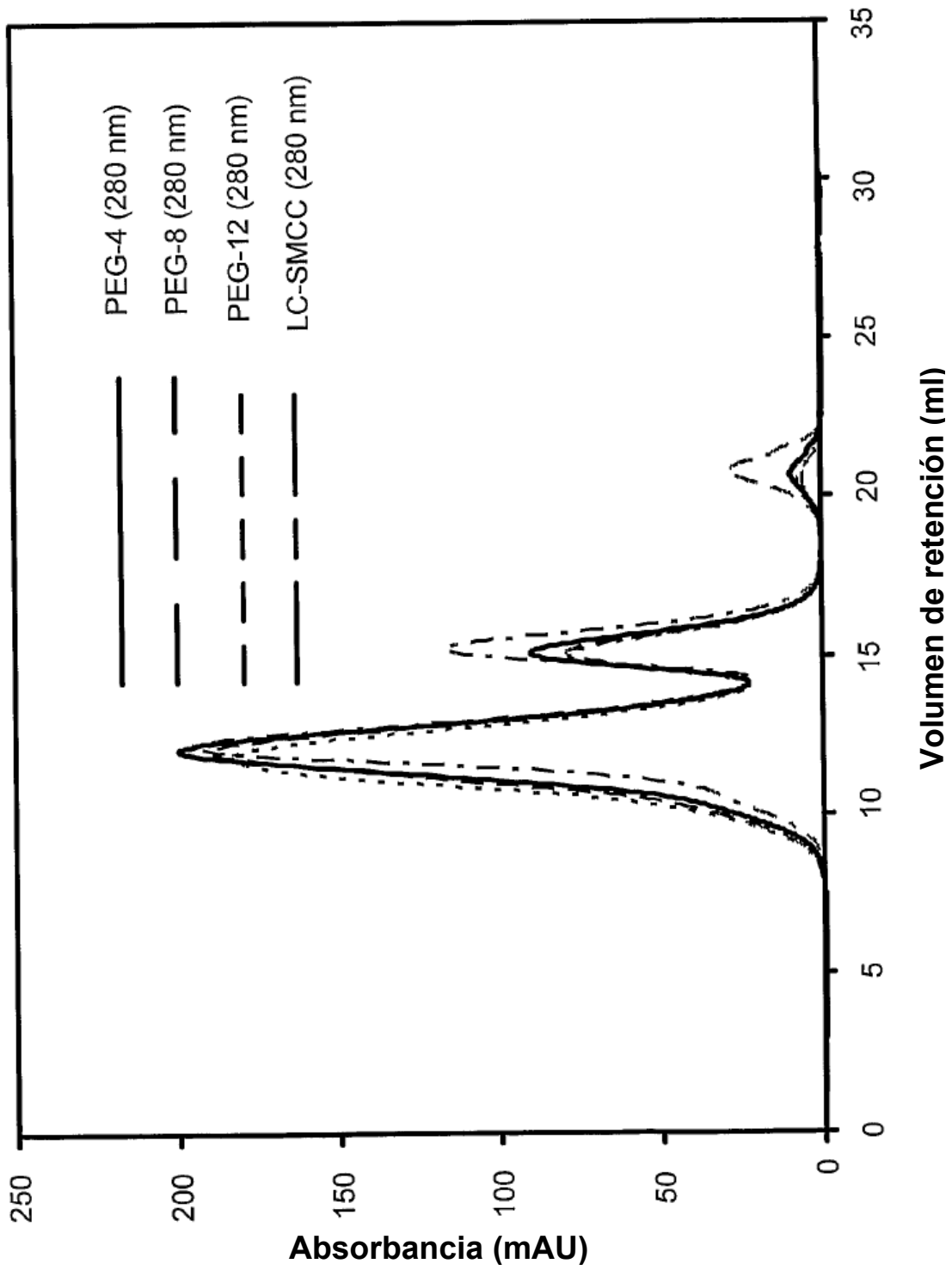


FIG. 18

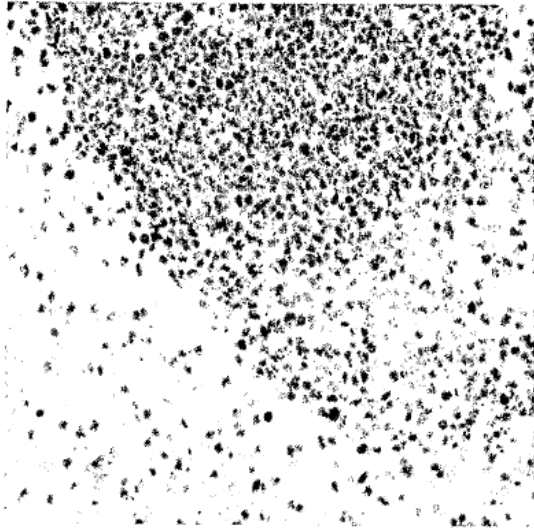


FIG. 19A

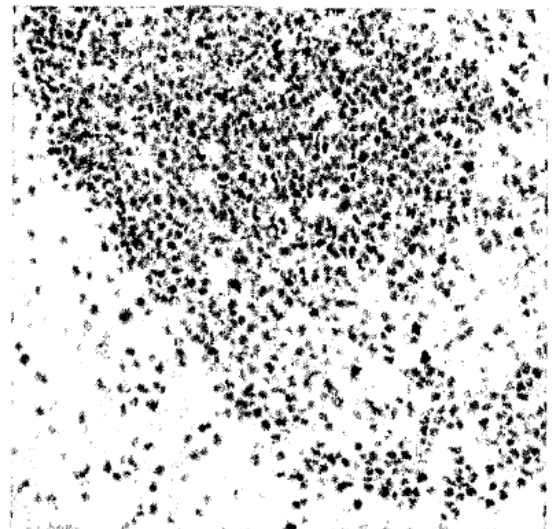


FIG. 19B

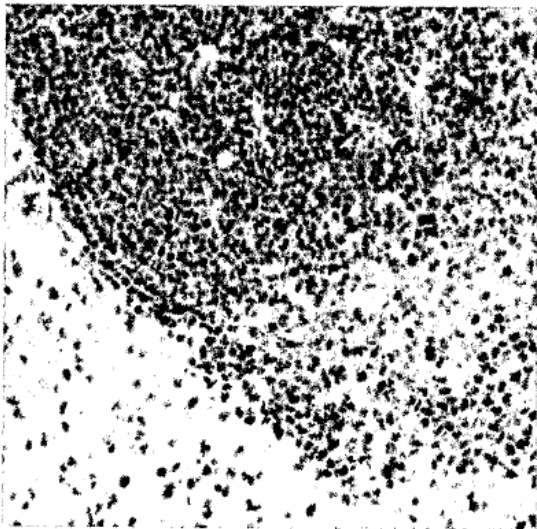


FIG. 19C

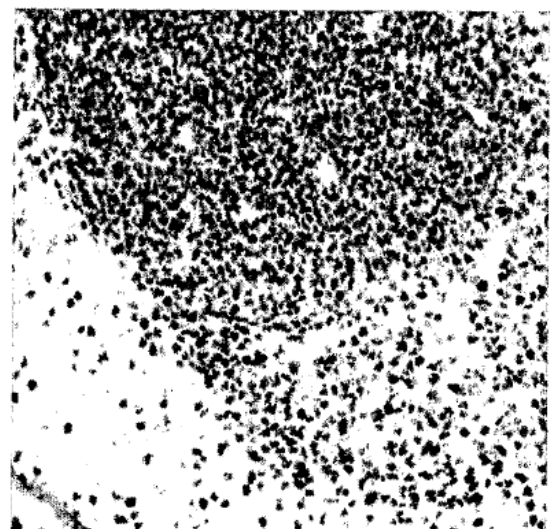


FIG. 19D

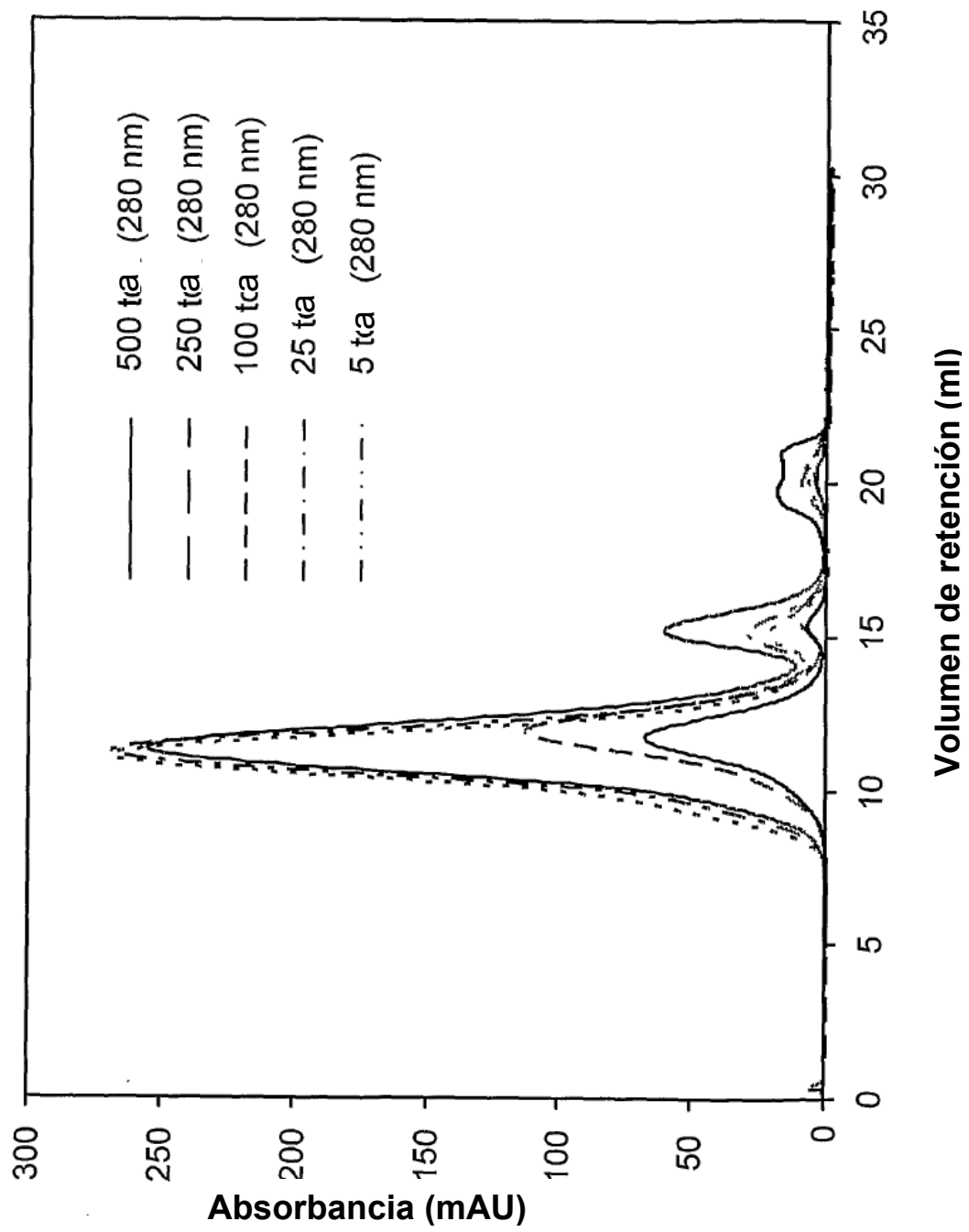


FIG. 20

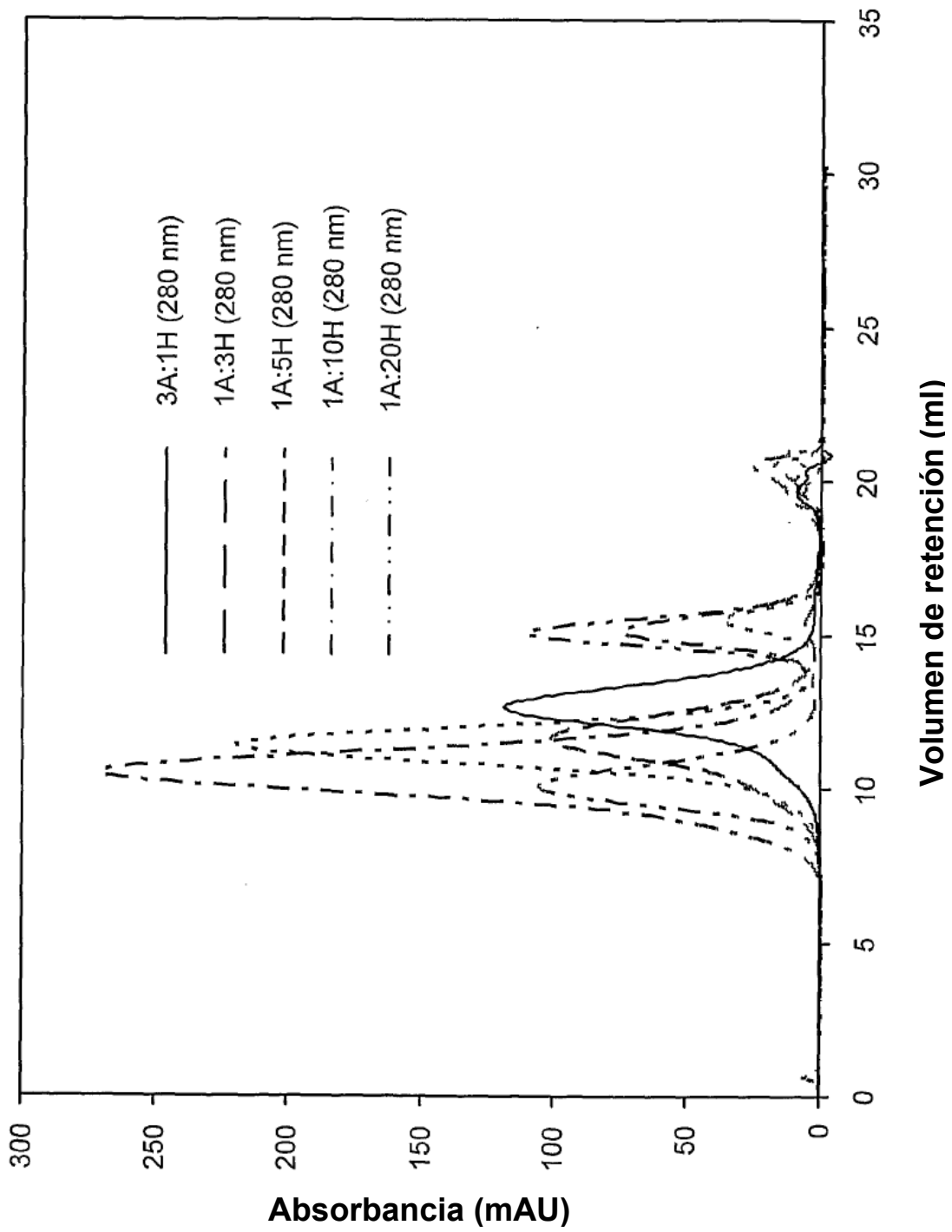


FIG. 21

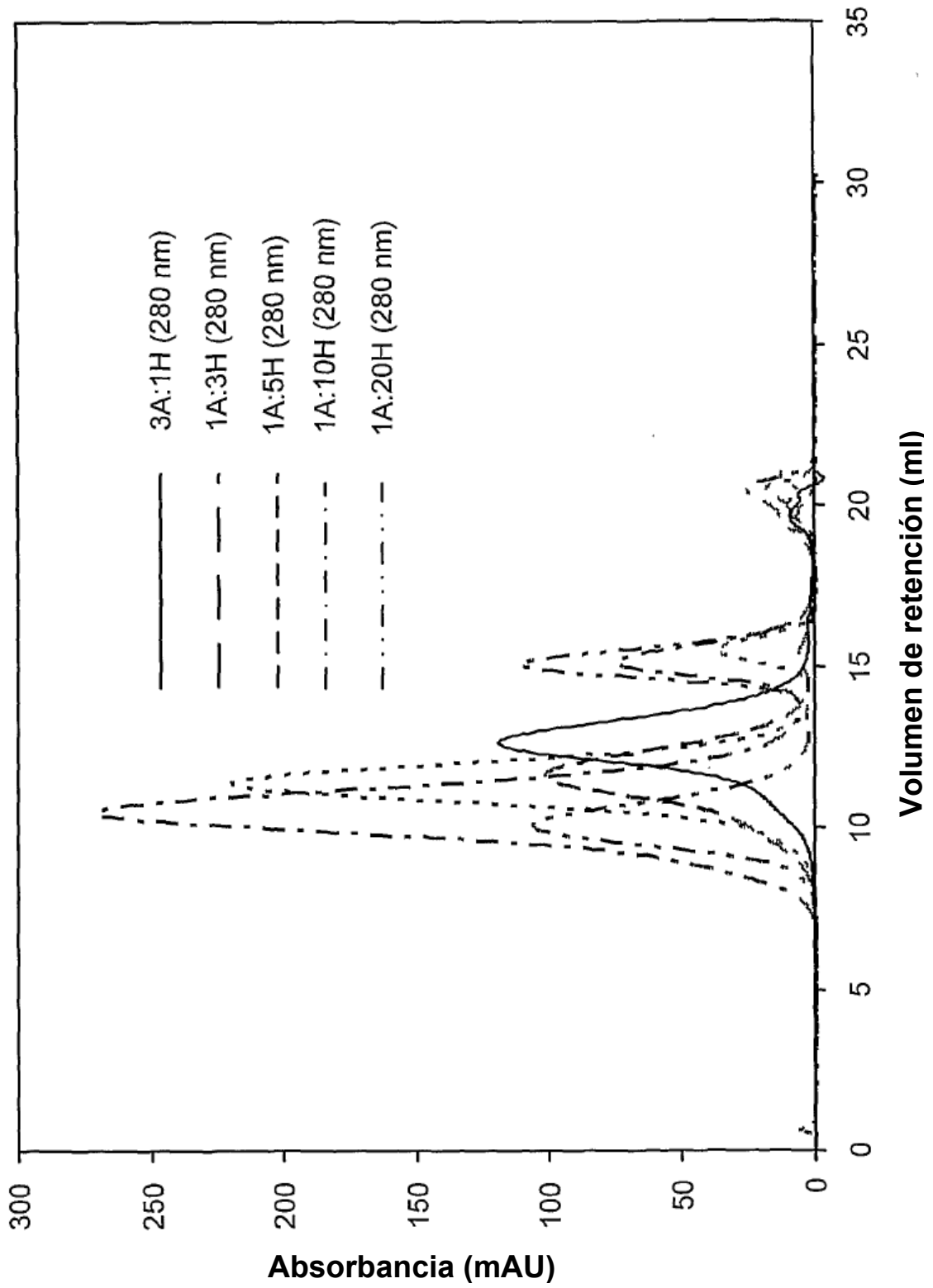


FIG. 22