

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 647**

51 Int. Cl.:

G01N 33/536 (2006.01)

C07C 233/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2008 PCT/US2008/060815**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08131216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008 E 08746264 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2140263**

54 Título: **Compuestos de hapteno y composiciones y usos de los mismos**

30 Prioridad:

20.04.2007 US 913124 P

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

26.06.2017

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ARKANSAS (100.0%)
4301 W. Markham St. 831, Little Rock
Arkansas 72205-7199, US**

72 Inventor/es:

**OWENS, S. MICHAEL;
GUNNELL, MELINDA y
CARROLL, F. IVY**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 619 647 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

Compuestos de hapteno y composiciones y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La invención se refiere por lo general a compuestos de hapteno que comprenden cualquiera de (+) o (-) metanfetamina o (+) o (-) anfetamina conjugada con un conector. Hablando en términos generales, los compuestos de hapteno de la invención se pueden usar para inducir una respuesta inmunológica con respecto a una o más de
10 (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)3,4-metilendioximetanfetamina ((+)MDMA).

Antecedentes de la invención

La adicción a la (+)-metanfetamina ((+)MET) se ha convertido en la principal amenaza farmacológica en América
15 (NACO, 2005) y se necesitan en gran medida estrategias de tratamiento eficaces para la adicción de (+)MET y estimulantes relacionados. Las farmacoterapias actuales para gestionar el sistema cardiovascular agudo, sistema nervioso central y efectos tóxicos son en su mayoría de apoyo (Sato, 1992; Albertson *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 1999); y no hacen nada para retirar el fármaco de sus sitios de acción en el cerebro. También faltan medicamentos que puedan reducir o tratar los efectos médicamente incapacitantes de la adicción a (+)MET. Los anticuerpos
20 proporcionan una medicación potencial atractiva que puede dirigirse al fármaco en lugar del sitio de acción (Kosten y Owens, 2005). Estos medicamentos basados en proteínas de alta afinidad actúan como los denominados antagonistas farmacocinéticos, secuestrando el fármaco en el torrente sanguíneo lejos de tejidos vulnerables desde el punto de vista médico como el cerebro y el corazón.

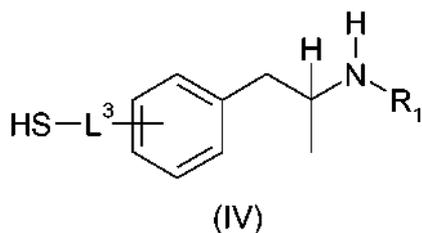
A diferencia de la nicotina y la cocaína, con las que los efectos son causados por un solo compuesto específico, los fármacos tales como opiáceos (por ejemplo, morfina), arilciclohexilaminas (por ejemplo, fenciclidina) y anfetaminas (por ejemplo, (+)MET) son estructuras de partida a partir de las que se pueden sintetizar muchos compuestos farmacológicamente similares. Estas denominadas "drogas de diseño" se pueden modificar químicamente para
25 alterar sus efectos. Por lo tanto, para que un anticuerpo tenga la aplicabilidad médica más amplia, debería tener alta afinidad y especificidad para otros miembros de esta clase de fármacos médicamente importantes (es decir, (+)MET, (+)AMP y (+)MDMA).

Hay otros problemas de diseño de medicamentos que complican aún más el desarrollo de tratamientos eficaces para
35 estimulantes similares a la (+)MET. En primer lugar, la (+)MET es uno de varios fármacos estimulantes de adicción con efectos similares o solapantes. En particular, la (+)AMP es a la vez un metabolito farmacológicamente activo de (+)MET y un fármaco de uso frecuente se puede sustituir por (+)MET. En segundo lugar, la (+/-)-3,4-metilendioximetanfetamina es la mezcla racémica comúnmente denominada MDMA o éxtasis. El isómero más ((+)(MDMA) tiene predominantemente actividad dopaminérgica, similar a un estimulante, con efectos solapantes con (+)MET, mientras que la (-)MDMA tiene efectos predominantemente serotoninérgicos (Cho y Segal, 1994). La
40 (+)MET, (+)AMP y (+)MDMA pueden producir efectos potencialmente mortales a dosis elevadas (Cho y Segal, 1994; Farre *et al.*, 2004). Además, todos estos fármacos son estereoisómeros dextrógiros, con los isómeros levógiros teniendo un perfil o efectos farmacológicos significativamente diferentes. Por ejemplo, la (-)-metanfetamina se usa comúnmente como un broncodilatador en los medicamentos sin receta médica. Los isómeros levógiros de estos fármacos podrían ser ingeridos potencialmente de forma intencionada por los toxicómanos para neutralizar las
45 medicaciones de mAb con alta afinidad de unión para ambos estereoisómeros dextrógiros y levógiros. De forma relacionada, existen muchos compuestos estructuralmente similares, tales como la efedrina y la pseudoefedrina, que se podrían usar para disminuir la eficacia de los anticuerpos si el anticuerpo no es altamente específico para estructuras similares a la de la (+)MET. El documento US 7 202 348 describe la generación y uso de anticuerpos monoclonales de alta afinidad (MAb) y sus derivados como antagonistas estimulantes de acción prolongada para
50 tratar problemas médicos asociados con el abuso de drogas y adicción. Los fragmentos de unión al antígeno (Fab) y otros fragmentos de molécula pequeña de estos anticuerpos monoclonales pueden servir como antagonistas estimulantes de acción más corta para tratar problemas médicos como sobredosis de fármacos.

Por lo tanto, en la técnica existe una necesidad de haptenos diseñados para inducir una respuesta inmunológica que
55 puedan generar anticuerpos específicos que reconozcan al menos uno o más de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA, y que no reaccionen de forma cruzada sustancialmente con (-)metanfetamina, (-) anfetamina, o (-)MDMA, o medicamentos sin receta médica.

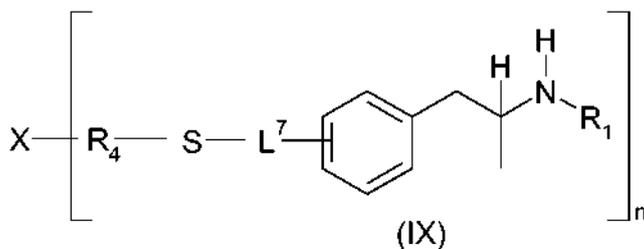
Sumario de la invención

60 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención incluye un compuesto, compuesto que consiste en el isómero (+) de fórmula (IV):



en la que:

- 5 R_1 es hidrógeno o metilo; y
 L^3 es un conector de 10 átomos contiguos unidos al anillo de benceno en la posición meta, siendo los átomos seleccionados entre el grupo que consiste en un átomo de un hidrocarbilo, un átomo de un hidrocarbilo sustituido, y un heteroátomo.
- 10 Un segundo aspecto de la invención incluye un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que el compuesto está conjugado con una molécula vehículo, X, para formar un compuesto que tiene la fórmula (IX):



15 en la que:

- R_1 es como se define en el primer aspecto;
 n es un número entero mayor o igual que 3;
 20 X es una molécula vehículo que induce una respuesta inmunológica;
 R_4 se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace directo, hidrocarbilo, e hidrocarbilo sustituido;
 L^7 es L^3 como se define en el primer aspecto.

25 Un tercer aspecto de la invención incluye un compuesto de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención, para su uso para generar anticuerpos específicos para dicho compuesto en un sujeto.

30 Otros aspectos y repeticiones de la invención se describen con más detalle a continuación.

Referencia a las figuras en color

El archivo de solicitud contiene al menos una fotografía realizada en color.

35 Breve descripción de las figuras

Fig. 1 presenta alineamientos de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cinco mAb de afinidad moderada a elevada, anti-(+)**MET** y anti-(+)**MET**/(+)**AMP**, y anti-(+)**MET**/(+)**AMP**/(+)**MDMA** (en el presente documento, mAb se refiere a anticuerpos monoclonales, tanto en singular como en plural). El Panel A presentará las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas. El Panel B presenta las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras. Las secuencias se presentan en notación de aminoácidos de una sola letra y se enumeran de acuerdo con Kabat y Wu (1991 J Immunol 147: 1709-1719). La ubicación de los restos de armazón (FR) y CDR se indican para las cadenas pesadas y las cadenas ligeras.

45 **Fig. 2** presenta modelos moleculares de tres mAb anti-(+)**MET**. Panel superior: Vista en estéreo de modelos moleculares superpuestos de mAb anti-(+)**MET**. Las regiones variables de los tres mAb se modelaron, se alinearon de forma estructural y se representan en formato de viñeta. Los restos de armazón se representan en color azul. Las regiones CDR están coloreadas de acuerdo con el mAb: mAb6H4, color azul; mAb6H8, red color

rojo; mAb4G9, color verde. Las regiones de cadena pesada, cadena ligera, y CDR están etiquetadas. Panel inferior: RMSD (Å) de las CDR a partir de la conformación de la cadena principal de mAb6H4.

Fig. 3 ilustra estructuras modeladas de las cadenas variables de mAb anti-(+)MET. En este modelo, la MET (magenta) se ha replicado por vía informática en un bolsillo en la superficie de contacto de las cadenas VH y VL con el software FlexX. Paneles a la izquierda: Representación superficial del bolsillo profundo en mAb6H4 y mAb4G9. El dominio de la cadena VL se encuentra en el lado izquierdo en color azul y el dominio de la cadena VH se encuentra en el lado derecho en color verde. Paneles a la derecha: Representación de barras de mAb6H4 y mAb4G9. Con fines de claridad, solamente se muestran las cadenas laterales con 8 angstroms de la molécula de MET. La vista está orientada en una "vista superior" con el mismo esquema de colores que en el panel del lado izquierdo. Las cadenas laterales están etiquetadas y numeradas en el esquema de Kabat al igual que en la Fig 1.

Fig. 4 ilustra el acoplamiento de mercapto-haptenos a proteína vehículo activada por maleimida. (A) el de mercapto-hapteno, (+)MET-SH-MO10, se conjuga con vehículo, BSA, en una manera lineal hasta un máximo de 10 haptenos por BSA. Se añadieron cantidades crecientes de hapteno, (+)MET-SH-MO10 a soluciones que contenían una cantidad constante de BSA activado con vehículo. La densidad del epítipo, el número de moléculas de hapteno unidas a una sola proteína vehículo, se analizó por MALDI-TOF MS y se representó frente a la proporción correspondiente en la reacción de conjugación. (B) Análisis de MALDI-TOF MS de ovoalbúmina activada con maleimida (panel superior), y el hapteno (+)MET-SH-MO10 recién generado acoplado a ovoalbúmina activada con maleimida (panel inferior). (C) El mercapto-hapteno, (+)MET-SH-MO10, conjugado con ovoalbúmina, genera anticuerpos monoclonales específicos para (+)MET y (+)MDMA. Se muestran los datos de un mAb representativo. La unión de la (+)MET radioetiquetada incubada con mAb se inhibe usando cantidades crecientes de fármacos sin etiquetar, es decir (+)MET, (+)AMP, o (+)MDMA. La inhibición de la unión a mAb se cuantifica y se representa frente a la cantidad de fármaco frío usado como inhibidor. En el valor de inhibición de un 50 %, la concentración de fármacos sin etiquetar se aproxima a la afinidad del mAb para ese fármaco.

Fig. 5 ilustra respuestas inmunes a conjugado de (+)MET P6 hapteno-KLH. Comparación de titulaciones de anticuerpo anti-(+)MET de rata con ELISA. Animales inmunizados con KLH (■); animales inmunizados con (+)MET P6-KLH (●); y animales inmunizados con (+)MET P6-KLH con estimulaciones repetidas de (+)MET *ip*, de 3 mg/kg (○).

Fig. 6 representa afinidades de anticuerpo en suero de rata para (+)MET tal como se determina mediante ELISA. Ratas inmunizadas con (+)MET P6-KLH (●); ratas inmunizadas con (+)MET P6-KLH con estimulaciones repetidas con (+)MET (○).

Fig. 7 ilustra la eliminación de (+)MET en el cerebro. Perfiles de concentración media con respecto al tiempo para (+)MET en el cerebro sin mAb6H4 (●), en una sobredosis (□), y en un modelo de tratamiento previo (○). El * indica que los puntos tanto de sobredosis como de tratamiento previo son estadísticamente diferentes del control ($P < 0,05$). El † indica que solamente los puntos de tiempo de tratamiento previo son estadísticamente significativos con respecto al control ($P < 0,05$).

Fig. 8 presenta la concentración en suero de (+)MET con el tiempo. Concentraciones de (+)MET antes (símbolo □ con una "M" dentro) y después del tratamiento (símbolos abiertos) con cinco concentraciones diferentes de los mAb anti-(+)MET ($n = 3$ ratas/punto temporal) y (+)AMP antes (símbolo □ con una "A" dentro) y después del tratamiento (círculos rellenos) con mAb4G9. Las concentraciones de (+)AMP (círculos rellenos) se muestran solamente para mAb4G9 porque los otros cuatro mAb no producían aumentos a largo plazo en las concentraciones de (+)AMP. La línea de mejor ajuste se determinó usando un modelo fármaco que de dos compartimentos ponderado.

Fig. 9 presenta un diagrama que ilustra un método para preparar un conjugado de hapteno con una conexión de amida. El método comprende el acoplamiento de MO10 directamente a CRM₁₉₇ usando clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), o, para proporcionar conjugados con diferentes conectores, la conversión de CRM₁₉₇ en TFCS-CRM₁₉₇ mediante el éster de N-(ε-trifluoracetilcaproloxi)succinimida (TFCS), y a continuación acoplamiento a MO6 y MO10 usando EDC para dar MO6-TFCS-CRM₁₉₇ o MO10-TFCS-CRM₁₉₇.

Fig. 10 presenta un diagrama que ilustra un método para preparar un conjugado de hapteno con una conexión de sulfuro. El método comprende hacer reaccionar CRM₁₉₇ con 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfuro. El método comprende hacer reaccionar CRM₁₉₇ con 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfuro (Sulfo-SMCC) a pH 7-9 para proporcionar el MCC-CRM₁₉₇ activado con maleimida estable. La adición de SH-MO10 a MCC-CRM₁₉₇ a pH 7 proporcionará el conjugado SH-MO10-MCC-CRM₁₉₇.

Fig. 11 presenta un diagrama que ilustra la preparación de compuestos de hapteno con grupos terminales de ácido carboxílico.

Fig. 12 presenta un diagrama que ilustra la preparación de compuestos de hapteno con grupos terminales de mercaptano.

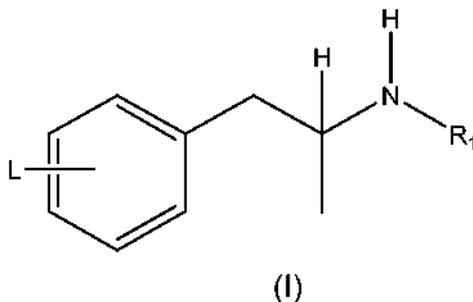
Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona compuestos de hapteno se pueden usar para inducir una respuesta inmunológica a uno o más de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA. En particular, la presente invención proporciona compuestos que se pueden usar para generar anticuerpos que reconocen uno o más de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA. De forma ventajosa, los compuestos de la presente invención se pueden usar para generar anticuerpos que reconocen al menos uno o más de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA, y que sustancialmente no presentan reacción cruzada con (-)metanfetamina, (-)anfetamina, o (-)MDMA, o medicamentos

sin receta médica.

I. Compuestos de Hapteno

- 5 La invención incluye un compuesto de hapteno que comprende cualquiera de (+) metanfetamina o (+) anfetamina conjugada con un conector. En una realización a modo de ejemplo, el compuesto se diseña para generar anticuerpos que reconocen los tres compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y (+)MDMA.
- 10 En un ejemplo comparativo, el compuesto de hapteno tiene el isómero (+) o (-)de fórmula (I):



en la que:

- 15 R_1 es hidrógeno o a metilo; y
L es un conector.

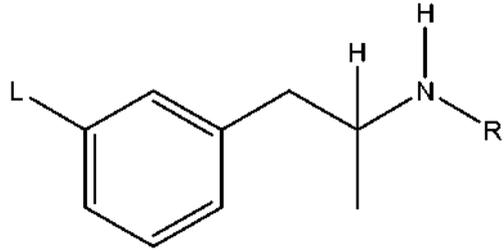
- 20 En algunos ejemplos comparativos, R_1 es hidrógeno (es decir, forma (+) o (-) anfetamina). En otros ejemplos comparativos, R_1 es un grupo metilo (es decir, forma (+) o (-) metanfetamina). En una realización, el compuesto comprende (+)anfetamina. En otro ejemplo comparativo, el compuesto comprende (-)anfetamina. En una realización alternativa, el compuesto comprende (+)metanfetamina. En otro ejemplo comparativo, el compuesto comprende (-)metanfetamina.
- 25 En general, L está formado por átomos y tiene una longitud suficiente de modo que L es lo suficientemente flexible como para facilitar una orientación de la (+) o (-)metanfetamina o la (+) o (-)anfetamina suficiente para generar los anticuerpos deseados. En este contexto, los anticuerpos "deseados" incluyen anticuerpos que reconocen (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA. Por lo general, L tampoco es fuertemente inmunogénico. En otras palabras, L se puede diseñar de modo que los anticuerpos generados frente a un compuesto de la invención reconozcan el compuesto y no simplemente a L.
- 30

- La longitud exacta de L puede variar y variará. Por lo general, L tiene una longitud de al menos 10 angstroms. En otra realización, L puede tener una longitud de aproximadamente 10 angstroms a aproximadamente 27 o superior angstroms. En otra realización, L tiene una longitud de al menos 11 angstroms, al menos 12 angstroms, al menos 13 angstroms, al menos 14 angstroms, al menos 15 angstroms, al menos 16 angstroms, al menos 17 angstroms, al menos 18 angstroms, al menos 19 angstroms, al menos 20 angstroms, al menos 21 angstroms, al menos 22 angstroms, al menos 23 angstroms, al menos 24 angstroms, al menos 25 angstroms, al menos 26 angstroms, o al menos 27 angstroms. La longitud del conector, cuando se expresa en angstroms, se puede determinar realizando un estudio de modelado, usando, por ejemplo, el campo de fuerza de MM94. Indicado de otra manera, la longitud de L se puede expresar como el número de átomos contiguos que forman la ruta más corta desde una subestructura que conecta a L con la otra subestructura. En un ejemplo comparativo, L tiene una longitud de al menos 8 átomos contiguos. En otro ejemplo comparativo, L puede tener una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 100 o más átomos. En ejemplo un comparativo adicional, L tiene una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 o más átomos contiguos. En un ejemplo comparativo, si L está formado por menos de 13 átomos contiguos, entonces el último átomo del conector opuesto a su punto de unión con respecto al anillo de benceno del compuesto no forma un ácido carboxílico.
- 35
40
45

- Tal como observará un experto en la materia, los átomos que comprenden L pueden variar ampliamente. Por lo general, los átomos imparten el grado de flexibilidad apropiado, como se ha detallado anteriormente. Los átomos adecuados que forman L se pueden seleccionar entre el grupo que comprende hidrógeno, hidrocarbilo, hidrocarbilos sustituidos, y que heteroátomos. En algunos ejemplos comparativos, L puede estar formado por aminoácidos, tales como glicina o prolina. Por ejemplo, L puede ser un péptido. En otros ejemplos comparativos, L puede estar formado por nucleótidos. En ejemplos comparativos adicionales, L puede ser lineal, ramificado, o puede comprender estructuras de anillo.
- 50

También se prevé que L se pueda unir al anillo de benceno de (+) o (-)metanfetamina o (+) o (-)anfetamina en una diversidad de posiciones sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, en un ejemplo comparativo, L se puede unir en la posición meta del anillo de benceno como se muestra en la fórmula (XI):

5

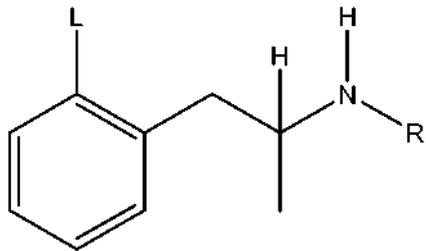


(XI)

en la que:

10 L y R₁ tienen los mismos sustituyentes que se han detallado para compuestos que corresponden a la fórmula (I).

En un ejemplo comparativo, L se puede unir en la posición orto como se muestra en la fórmula (XII):



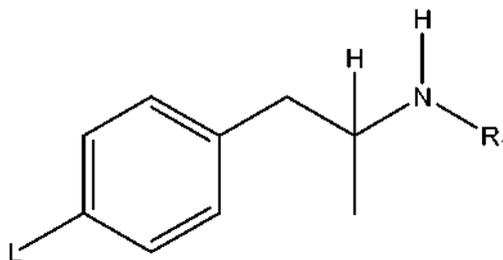
(XII)

15

en la que:

L y R₁ tienen los mismos sustituyentes que se han detallado para compuestos que corresponden a la fórmula (I).

20 En un ejemplo comparativo, L se puede unir en la posición para como se muestra en la fórmula (XIII):



(XIII)

en la que:

25

L y R₁ tienen los mismos sustituyentes que se han detallado para compuestos que corresponden a la fórmula (I).

Los ejemplos comparativos de L pueden estar formados por $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{COOH}$, en el que m es un número entero entre aproximadamente 11 y aproximadamente 30; $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{COOH}$, en el que m es un número entero entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30; $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{SH}$, en el que m es un número entero entre aproximadamente 7 y aproximadamente 30; $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{SH}$, en el que m es un número entero entre 5 aproximadamente 6 y aproximadamente 30; $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{(CH)}_4\text{CH}_3$, en el que m es un número entero entre aproximadamente 3 y aproximadamente 30; $\text{O(CH}_2\text{)}_m\text{(CH)}_4\text{CH}_3$, en el que m es un número entero entre aproximadamente 2 y aproximadamente 30. L puede estar formado por un grupo enumerado en la Tabla A.

10

TABLA A

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
$\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_8\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_8\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_8\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_9\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_9\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_9\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{13}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{13}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{13}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{15}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{15}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{15}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{ NH}_2$	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
$\text{-(CH}_2\text{)}_{17}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{17}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{17}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{18}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{18}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{18}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{19}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{19}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{19}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{20}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{20}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{20}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{21}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{21}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{21}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{22}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{22}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{22}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{23}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{23}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{23}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{24}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{24}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{24}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{25}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{25}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{25}\text{ NH}_2$	Orto
$\text{-(CH}_2\text{)}_{26}\text{ NH}_2$	Para
$\text{-(CH}_2\text{)}_{26}\text{ NH}_2$	Meta
$\text{-(CH}_2\text{)}_{26}\text{ NH}_2$	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
$-(\text{CH}_2)_{27} \text{NH}_2$	Para
$-(\text{CH}_2)_{27} \text{NH}_2$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{27} \text{NH}_2$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{28} \text{NH}_2$	Para
$-(\text{CH}_2)_{28} \text{NH}_2$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{28} \text{NH}_2$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{29} \text{NH}_2$	Para
$-(\text{CH}_2)_{29} \text{NH}_2$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{29} \text{NH}_2$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{30} \text{NH}_2$	Para
$-(\text{CH}_2)_{30} \text{NH}_2$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{30} \text{NH}_2$	Orto
$-(\text{CH}_2)_7 \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_7 \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_7 \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_8 \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_8 \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_8 \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_9 \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_9 \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_9 \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{10} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{10} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{10} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{11} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{11} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{11} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{12} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{12} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{12} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{13} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{13} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{13} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{14} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{14} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{14} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{15} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{15} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{15} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{16} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{16} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{16} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{17} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{17} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{17} \text{OH}$	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
$-(\text{CH}_2)_{18} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{18} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{18} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{19} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{19} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{19} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{20} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{20} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{20} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{21} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{21} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{21} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{22} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{22} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{22} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{23} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{23} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{23} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{24} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{24} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{24} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{25} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{25} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{25} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{26} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{26} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{26} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{27} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{27} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{27} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{28} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{28} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{28} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{29} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{29} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{29} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_{30} \text{OH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_{30} \text{OH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_{30} \text{OH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_7 \text{SH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_7 \text{SH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_7 \text{SH}$	Orto
$-(\text{CH}_2)_8 \text{SH}$	Para
$-(\text{CH}_2)_8 \text{SH}$	Meta
$-(\text{CH}_2)_8 \text{SH}$	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
-(CH ₂) ₉ SH	Para
-(CH ₂) ₉ SH	Meta
-(CH ₂) ₉ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₀ SH	Para
-(CH ₂) ₁₀ SH §	Meta
-(CH ₂) ₁₀ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₁ SH	Para
-(CH ₂) ₁₁ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₁ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₂ SH	Para
-(CH ₂) ₁₂ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₂ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₃ SH	Para
-(CH ₂) ₁₃ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₃ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₄ SH	Para
-(CH ₂) ₁₄ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₄ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₅ SH	Para
-(CH ₂) ₁₅ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₅ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₆ SH	Para
-(CH ₂) ₁₆ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₆ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₇ SH	Para
-(CH ₂) ₁₇ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₇ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₈ SH	Para
-(CH ₂) ₁₈ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₈ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₉ SH	Para
-(CH ₂) ₁₉ SH	Meta
-(CH ₂) ₁₉ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₀ SH	Para
-(CH ₂) ₂₀ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₀ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₁ SH	Para
-(CH ₂) ₂₁ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₁ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₂ SH	Para
-(CH ₂) ₂₂ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₂ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₃ SH	Para
-(CH ₂) ₂₃ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₃ SH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
-(CH ₂) ₂₄ SH	Para
-(CH ₂) ₂₄ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₄ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₅ SH	Para
-(CH ₂) ₂₅ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₅ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₆ SH	Para
-(CH ₂) ₂₆ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₆ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₇ SH	Para
-(CH ₂) ₂₇ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₇ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₈ SH	Para
-(CH ₂) ₂₈ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₈ SH	Orto
-(CH ₂) ₂₉ SH	Para
-(CH ₂) ₂₉ SH	Meta
-(CH ₂) ₂₉ SH	Orto
-(CH ₂) ₃₀ SH	Para
-(CH ₂) ₃₀ SH	Meta
-(CH ₂) ₃₀ SH	Orto
-(CH ₂) ₁₁ COOH	Para
-(CH ₂) ₁₁ COOH	Meta
-(CH ₂) ₁₁ COOH	Orto
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Para
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Meta
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Orto
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Para
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Meta
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Orto
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Para
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Meta
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Orto
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Para
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Meta
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Orto
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Para
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Meta
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Orto
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Para
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Meta
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Orto
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Para
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Meta
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
-O(CH ₂) ₂₄ NH ₂	Para
-O(CH ₂) ₂₄ NH ₂	Meta
-O(CH ₂) ₂₄ NH ₂	Orto
-O(CH ₂) ₂₅ NH ₂	Para
-O(CH ₂) ₂₅ NH ₂	Meta
-O(CH ₂) ₂₅ NH ₂	Orto
-O(CH ₂) ₂₆ NH ₂	Para
-O(CH ₂) ₂₆ NH ₂	Meta
-O(CH ₂) ₂₆ NH ₂	Orto
-O(CH ₂) ₂₇ NH ₂	Para
-O(CH ₂) ₂₇ NH ₂	Meta
-O(CH ₂) ₂₇ NH ₂	Orto
-O(CH ₂) ₂₈ NH ₂	Para
-O(CH ₂) ₂₈ NH ₂	Meta
-O(CH ₂) ₂₈ NH ₂	Orto
-O(CH ₂) ₂₉ NH ₂	Para
-O(CH ₂) ₂₉ NH ₂	Meta
-O(CH ₂) ₂₉ NH ₂	Orto
-O(CH ₂) ₃₀ NH ₂	Para
-O(CH ₂) ₃₀ NH ₂	Meta
-O(CH ₂) ₃₀ NH ₂	Orto
-O(CH ₂) ₆ OH	Para
-O(CH ₂) ₆ OH	Meta
-O(CH ₂) ₆ OH	Orto
-O(CH ₂) ₇ OH	Para
-O(CH ₂) ₇ OH	Meta
-O(CH ₂) ₇ OH	Orto
-O(CH ₂) ₈ OH	Para
-O(CH ₂) ₈ OH	Meta
-O(CH ₂) ₈ OH	Orto
-O(CH ₂) ₉ OH	Para
-O(CH ₂) ₉ OH	Meta
-O(CH ₂) ₉ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₀ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₀ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₀ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₁ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₁ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₁ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₂ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₂ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₂ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₃ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₃ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₃ OH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
-O(CH ₂) ₁₄ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₄ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₄ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₅ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₅ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₅ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₆ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₆ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₆ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₇ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₇ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₇ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₈ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₈ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₈ OH	Orto
-O(CH ₂) ₁₉ OH	Para
-O(CH ₂) ₁₉ OH	Meta
-O(CH ₂) ₁₉ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₀ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₀ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₀ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₁ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₁ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₁ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₂ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₂ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₂ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₃ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₃ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₃ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₄ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₄ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₄ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₅ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₅ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₅ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₆ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₆ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₆ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₇ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₇ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₇ OH	Orto
-O(CH ₂) ₂₈ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₈ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₈ OH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
-O(CH ₂) ₂₉ OH	Para
-O(CH ₂) ₂₉ OH	Meta
-O(CH ₂) ₂₉ OH	Orto
-O(CH ₂) ₃₀ OH	Para
-O(CH ₂) ₃₀ OH	Meta
-O(CH ₂) ₃₀ OH	Orto
-O(CH ₂) ₆ SH	Para
-O(CH ₂) ₆ SH	Meta
-O(CH ₂) ₆ SH	Orto
-O(CH ₂) ₇ SH	Para
-O(CH ₂) ₇ SH	Meta
-O(CH ₂) ₇ SH	Orto
-O(CH ₂) ₈ SH	Para
-O(CH ₂) ₈ SH	Meta
-O(CH ₂) ₈ SH	Orto
-O(CH ₂) ₉ SH	Para
-O(CH ₂) ₉ SH §	Meta
-O(CH ₂) ₉ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Para
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Meta
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Orto
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Para
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Meta
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Orto
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Para
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Meta
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Orto
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Para
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Para
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Orto
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Para
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Meta
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Orto
‡ -X ₇ NH ₂	Para
‡ -X ₇ NH ₂	Meta
‡ -X ₇ NH ₂	Orto
‡ -X ₈ NH ₂	Para
‡ -X ₈ NH ₂	Meta
‡ -X ₈ NH ₂	Orto
‡ -X ₉ NH ₂	Para
‡ -X ₉ NH ₂	Meta
‡ -X ₉ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₀ NH ₂	Para
‡ -X ₁₀ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₀ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₁ NH ₂	Para
‡ -X ₁₁ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₁ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₂ NH ₂	Para
‡ -X ₁₂ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₂ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₃ NH ₂	Para
‡ -X ₁₃ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₃ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₄ NH ₂	Para
‡ -X ₁₄ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₄ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₅ NH ₂	Para
‡ -X ₁₅ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₅ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₆ NH ₂	Para
‡ -X ₁₆ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₆ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₇ NH ₂	Para
‡ -X ₁₇ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₇ NH ₂	Orto
‡ -X ₁₈ NH ₂	Para
‡ -X ₁₈ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₈ NH ₂	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
‡ -X ₁₉ NH ₂	Para
‡ -X ₁₉ NH ₂	Meta
‡ -X ₁₉ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₀ NH ₂	Para
‡ -X ₂₀ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₀ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₁ NH ₂	Para
‡ -X ₂₁ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₁ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₂ NH ₂	Para
‡ -X ₂₂ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₂ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₃ NH ₂	Para
‡ -X ₂₃ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₃ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₄ NH ₂	Para
‡ -X ₂₄ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₄ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₅ NH ₂	Para
‡ -X ₂₅ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₅ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₆ NH ₂	Para
‡ -X ₂₆ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₆ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₇ NH ₂	Para
‡ -X ₂₇ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₇ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₈ NH ₂	Para
‡ -X ₂₈ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₈ NH ₂	Orto
‡ -X ₂₉ NH ₂	Para
‡ -X ₂₉ NH ₂	Meta
‡ -X ₂₉ NH ₂	Orto
‡ -X ₃₀ NH ₂	Para
‡ -X ₃₀ NH ₂	Meta
‡ -X ₃₀ NH ₂	Orto
‡ -X ₇ OH	Para
‡ -X ₇ OH	Meta
‡ -X ₇ OH	Orto
‡ -X ₈ OH	Para
‡ -X ₈ OH	Meta
‡ -X ₈ OH	Orto
‡ -X ₉ OH	Para
‡ -X ₉ OH	Meta
‡ -X ₉ OH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
‡ -X ₁₀ OH	Para
‡ -X ₁₀ OH	Meta
‡ -X ₁₀ OH	Orto
‡ -X ₁₁ OH	Para
‡ -X ₁₁ OH	Meta
‡ -X ₁₁ OH	Orto
‡ -X ₁₂ OH	Para
‡ -X ₁₂ OH	Meta
‡ -X ₁₂ OH	Orto
‡ -X ₁₃ OH	Para
‡ -X ₁₃ OH	Meta
‡ -X ₁₃ OH	Orto
‡ -X ₁₄ OH	Para
‡ -X ₁₄ OH	Meta
‡ -X ₁₄ OH	Orto
‡ -X ₁₅ OH	Para
‡ -X ₁₅ OH	Meta
‡ -X ₁₅ OH	Orto
‡ -X ₁₆ OH	Para
‡ -X ₁₆ OH	Meta
‡ -X ₁₆ OH	Orto
‡ -X ₁₇ OH	Para
‡ -X ₁₇ OH	Meta
‡ -X ₁₇ OH	Orto
‡ -X ₁₈ OH	Para
‡ -X ₁₈ OH	Meta
‡ -X ₁₈ OH	Orto
‡ -X ₁₉ OH	Para
‡ -X ₁₉ OH	Meta
‡ -X ₁₉ OH	Orto
‡ -X ₂₀ OH	Para
‡ -X ₂₀ OH	Meta
‡ -X ₂₀ OH	Orto
‡ -X ₂₁ OH	Para
‡ -X ₂₁ OH	Meta
‡ -X ₂₁ OH	Orto
‡ -X ₂₂ OH	Para
‡ -X ₂₂ OH	Meta
‡ -X ₂₂ OH	Orto
‡ -X ₂₃ OH	Para
‡ -X ₂₃ OH	Meta
‡ -X ₂₃ OH	Orto
‡ -X ₂₄ OH	Para
‡ -X ₂₄ OH	Meta
‡ -X ₂₄ OH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
‡ -X ₂₅ OH	Para
‡ -X ₂₅ OH	Meta
‡ -X ₂₅ OH	Orto
‡ -X ₂₆ OH	Para
‡ -X ₂₆ OH	Meta
‡ -X ₂₆ OH	Orto
‡ -X ₂₇ OH	Para
‡ -X ₂₇ OH	Meta
‡ -X ₂₇ OH	Orto
‡ -X ₂₈ OH	Para
‡ -X ₂₈ OH	Meta
‡ -X ₂₈ OH	Orto
‡ -X ₂₉ OH	Para
‡ -X ₂₉ OH	Meta
‡ -X ₂₉ OH	Orto
‡ -X ₃₀ OH	Para
‡ -X ₃₀ OH	Meta
‡ -X ₃₀ OH	Orto
‡ -X ₇ SH	Para
‡ -X ₇ SH	Meta
‡ -X ₇ SH	Orto
‡ -X ₈ SH	Para
‡ -X ₈ SH	Meta
‡ -X ₈ SH	Orto
‡ -X ₉ SH	Para
‡ -X ₉ SH §	Meta
‡ -X ₉ SH	Orto
‡ -X ₁₀ SH	Para
‡ -X ₁₀ SH	Meta
‡ -X ₁₀ SH	Orto
‡ -X ₁₁ SH	Para
‡ -X ₁₁ SH	Meta
‡ -X ₁₁ SH	Orto
‡ -X ₁₂ SH	Para
‡ -X ₁₂ SH	Meta
‡ -X ₁₂ SH	Orto
‡ -X ₁₃ SH	Para
‡ -X ₁₃ SH	Meta
‡ -X ₁₃ SH	Orto
‡ -X ₁₄ SH	Para
‡ -X ₁₄ SH	Meta
‡ -X ₁₄ SH	Orto
‡ -X ₁₅ SH	Para
‡ -X ₁₅ SH	Meta
‡ -X ₁₅ SH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
‡ -X ₁₆ SH	Para
‡ -X ₁₆ SH	Meta
‡ -X ₁₆ SH	Orto
‡ -X ₁₇ SH	Para
‡ -X ₁₇ SH	Meta
‡ -X ₁₇ SH	Orto
‡ -X ₁₈ SH	Para
‡ -X ₁₈ SH	Meta
‡ -X ₁₈ SH	Orto
‡ -X ₁₉ SH	Para
‡ -X ₁₉ SH	Meta
‡ -X ₁₉ SH	Orto
‡ -X ₂₀ SH	Para
‡ -X ₂₀ SH	Meta
‡ -X ₂₀ SH	Orto
‡ -X ₂₁ SH	Para
‡ -X ₂₁ SH	Meta
‡ -X ₂₁ SH	Orto
‡ -X ₂₂ SH	Para
‡ -X ₂₂ SH	Meta
‡ -X ₂₂ SH	Orto
‡ -X ₂₃ SH	Para
‡ -X ₂₃ SH	Meta
‡ -X ₂₃ SH	Orto
‡ -X ₂₄ SH	Para
‡ -X ₂₄ SH	Meta
‡ -X ₂₄ SH	Orto
‡ -X ₂₅ SH	Para
‡ -X ₂₅ SH	Meta
‡ -X ₂₅ SH	Orto
‡ -X ₂₆ SH	Para
‡ -X ₂₆ SH	Meta
‡ -X ₂₆ SH	Orto
‡ -X ₂₇ SH	Para
‡ -X ₂₇ SH	Meta
‡ -X ₂₇ SH	Orto
‡ -X ₂₈ SH	Para
‡ -X ₂₈ SH	Meta
‡ -X ₂₈ SH	Orto
‡ -X ₂₉ SH	Para
‡ -X ₂₉ SH	Meta
‡ -X ₂₉ SH	Orto
‡ -X ₃₀ SH	Para
‡ -X ₃₀ SH	Meta
‡ -X ₃₀ SH	Orto

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
‡ -X ₁₁ COOH	Para
‡ -X ₁₁ COOH	Meta
‡ -X ₁₁ COOH	Orto
‡ -X ₁₂ COOH	Para
‡ -X ₁₂ COOH	Meta
‡ -X ₁₂ COOH	Orto
‡ -X ₁₃ COOH	Para
‡ -X ₁₃ COOH	Meta
‡ -X ₁₃ COOH	Orto
‡ -X ₁₄ COOH	Para
‡ -X ₁₄ COOH	Meta
‡ -X ₁₄ COOH	Orto
‡ -X ₁₅ COOH	Para
‡ -X ₁₅ COOH	Meta
‡ -X ₁₅ COOH	Orto
‡ -X ₁₆ COOH	Para
‡ -X ₁₆ COOH	Meta
‡ -X ₁₆ COOH	Orto
‡ -X ₁₇ COOH	Para
‡ -X ₁₇ COOH	Meta
‡ -X ₁₇ COOH	Orto
‡ -X ₁₈ COOH	Para
‡ -X ₁₈ COOH	Meta
‡ -X ₁₈ COOH	Orto
‡ -X ₁₉ COOH	Para
‡ -X ₁₉ COOH	Meta
‡ -X ₁₉ COOH	Orto
‡ -X ₂₀ COOH	Para
‡ -X ₂₀ COOH	Meta
‡ -X ₂₀ COOH	Orto
‡ -X ₂₁ COOH	Para
‡ -X ₂₁ COOH	Meta
‡ -X ₂₁ COOH	Orto
‡ -X ₂₂ COOH	Para

Grupo L	Posición en el anillo de Benceno
‡ -X ₂₂ COOH	Meta
‡ -X ₂₂ COOH	Orto
‡ -X ₂₃ COOH	Para
‡ -X ₂₃ COOH	Meta
‡ -X ₂₃ COOH	Orto
‡ -X ₂₄ COOH	Para
‡ -X ₂₄ COOH	Meta
‡ -X ₂₄ COOH	Orto
‡ -X ₂₅ COOH	Para
‡ -X ₂₅ COOH	Meta
‡ -X ₂₅ COOH	Orto
‡ -X ₂₆ COOH	Para
‡ -X ₂₆ COOH	Meta
‡ -X ₂₆ COOH	Orto
‡ -X ₂₇ COOH	Para
‡ -X ₂₇ COOH	Meta
‡ -X ₂₇ COOH	Orto
‡ -X ₂₈ COOH	Para
‡ -X ₂₈ COOH	Meta
‡ -X ₂₈ COOH	Orto
‡ -X ₂₉ COOH	Para
‡ -X ₂₉ COOH	Meta
‡ -X ₂₉ COOH	Orto
‡ -X ₃₀ COOH	Para
‡ -X ₃₀ COOH	Meta
‡ -X ₃₀ COOH	Orto

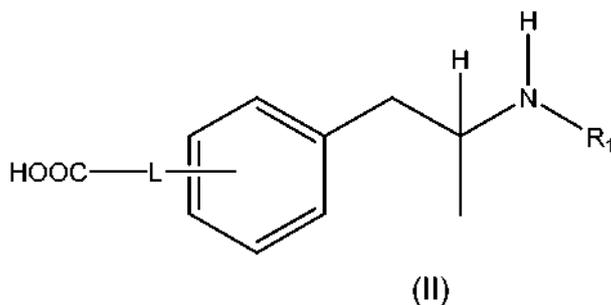
‡ en donde X puede ser cualquier átomo seleccionado del grupo que comprende C, O, N, P y S; incluyendo el número de hidrógenos adecuado para el balance de carga.

§ en donde L = L³-SH

En la técnica se conocen métodos para preparar compuestos de hapteno de fórmula (I) o se describen de otro modo en el presente documento. Por ejemplo, véase Byrnes-Blake *et al.*, 2001.

5

En un ejemplo comparativo, el compuesto de hapteno puede tener la fórmula (II):



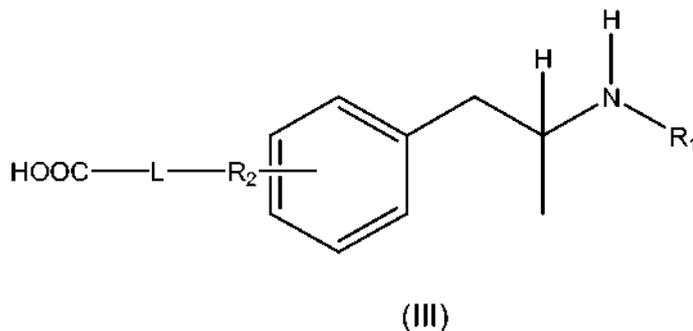
en la que:

5 R_1 y L son como se ha descrito para compuestos de hapteno que corresponden a la fórmula (I).

En un ejemplo comparativo para compuestos de hapteno que tienen la fórmula (II), L puede estar formado por $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{-}$, en el que m es un número entero entre aproximadamente 11 y aproximadamente 30. En un ejemplo comparativo, L puede estar formado por $\text{-O(CH}_2\text{)}_m\text{-}$, en el que m es un número entero entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30.

En la técnica se conocen métodos para preparar compuestos de fórmula (II). Por ejemplo, véase la figura 11 que representa un esquema que ilustra la preparación de compuestos con grupos terminales de ácido carboxílico.

15 En un ejemplo comparativo, el compuesto puede tener la fórmula (III):



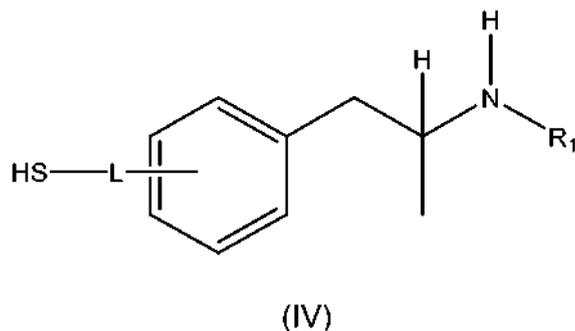
en la que:

20

R_1 y L son como se ha descrito para compuestos de hapteno que corresponden a la fórmula (I); y R_2 puede ser un heteroátomo.

En compuestos de ejemplos comparativos que corresponden a la fórmula (III), R_2 puede ser un átomo de carbono, un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno, un átomo de azufre, o un átomo de fósforo. En un ejemplo comparativo, R_2 puede ser un átomo de carbono. En un ejemplo comparativo, R_2 puede ser un átomo de oxígeno. En un ejemplo comparativo, R_2 puede ser un átomo de nitrógeno. En un ejemplo comparativo, R_2 puede ser un átomo de fósforo. En un ejemplo comparativo R_2 puede ser un átomo de azufre.

30 En un ejemplo comparativo, el compuesto de hapteno puede tener la fórmula (IV):



en la que:

5 R_1 y L son como se ha descrito para compuestos de hapteno que corresponden a la fórmula (I).

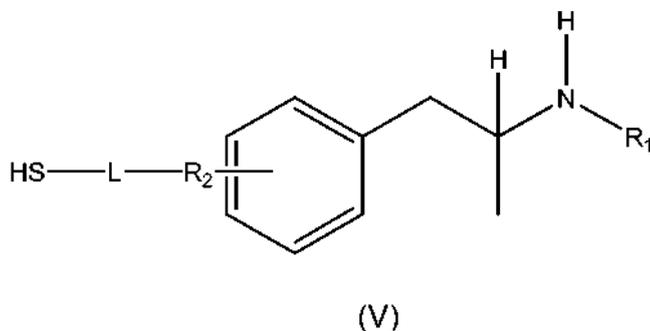
En un ejemplo comparativo para compuestos de hapteno que tienen la fórmula (IV), L puede estar formado por $(CH_2)_m$, en el que m es un número entero entre aproximadamente 7 y aproximadamente 30. En otras realizaciones más, L de fórmula (IV) puede estar formado por $O(CH_2)_m$, en el que m es un número entero entre

10 aproximadamente 6 y aproximadamente 30.

En la técnica se conocen métodos para preparar compuestos de fórmula (IV). Por ejemplo, véase la figura 12 que representa un esquema que ilustra la preparación de compuestos de la invención con grupos terminales de mercaptano.

15

En un ejemplo comparativo, el compuesto de hapteno puede tener la fórmula (V):



20 en la que:

R_1 y L son como se ha descrito para compuestos de hapteno que corresponden a la fórmula (I); y

R_2 puede ser un heteroátomo como se ha descrito anteriormente para compuestos que corresponden a la fórmula (III).

25

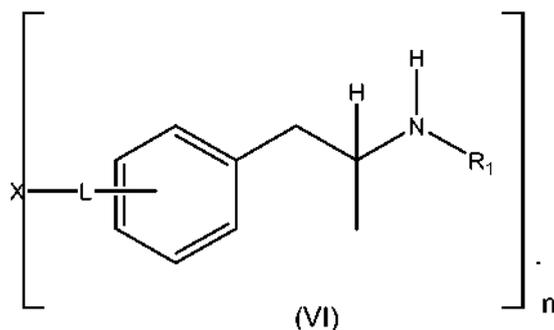
Los compuestos de hapteno que tienen la fórmula (I), (II), (III), (IV), o (V) se muestran en la Tabla A.

II. Compuestos de Hapteno Conjugados con Moléculas Vehículo

30 Los compuestos de hapteno que tienen las fórmulas (I), (II), (III), (IV) o (V) se pueden conjugar, a través de un conector, L, con una molécula vehículo X. Hablando en términos generales, la molécula vehículo se selecciona para que aumente la inmunogenicidad del compuesto de hapteno. Por ejemplo, la molécula vehículo puede proporcionar un epítipo de linfocitos T para aumentar la inmunogenicidad del compuesto de hapteno. Estos compuestos se pueden utilizar para una diversidad de usos adecuados que incluyen, como un compuesto inmunogénico terapéutico

35 (descrito con más detalle en el presente documento), y para inducir la generación de anticuerpos que se pueden utilizar en terapias pasivas con métodos de purificación o detección.

En un ejemplo comparativo, un compuesto de hapteno que corresponde a la fórmula (I) si conjugar a través de L con una molécula vehículo, X, para formar un compuesto que tiene la fórmula (VI):



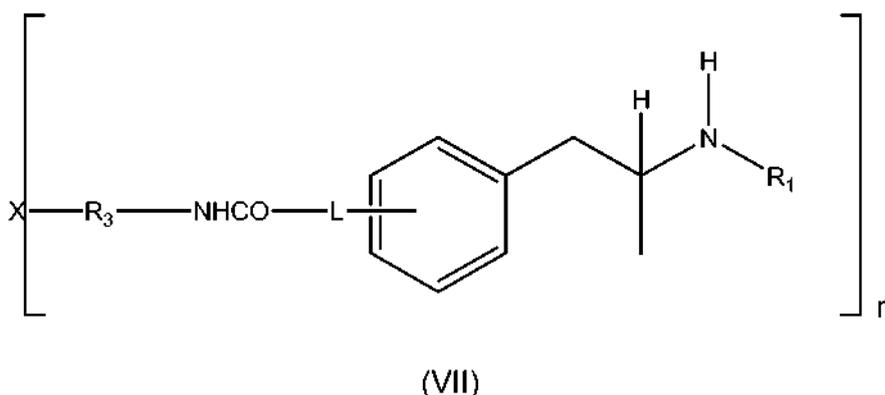
en la que:

- 5 R₁ y L son como se ha descrito para compuestos de hapteno que corresponden a la fórmula (I); X es una molécula vehículo que es capaz de inducir una respuesta inmunológica; y n es un número entero mayor o igual que 3.
- 10 Por lo general, X puede ser una proteína, lípido, carbohidrato, o cualquier combinación de los mismos que sea capaz de inducir una respuesta inmunológica. Por ejemplo, en una realización, X puede ser un polisacárido, tal como manano. En otra realización, X puede ser un lipopolisacárido, tal como un lipopolisacárido obtenido a partir de *Salmonella typhosa*.
- 15 En realizaciones a modo de ejemplo, X es una proteína. En una realización en particular X se puede seleccionar entre el grupo de proteínas que comprenden hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina, albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de oveja, tiroglobulina, y cualquier modificación, derivado o análogo de las mismas. Por ejemplo, en una realización, X puede ser BSA o BSA cationizada. En otra realización, X puede ser KLH. En otra realización más, X puede ser tiroglobulina.
- 20 En otra realización en particular, X puede ser una toxina o toxoide bacterianos. Los ejemplos no limitantes de toxinas o toxoides bacterianos adecuados pueden incluir toxoide tetánico, toxoide de difteria, toxoide de difteria CRM₁₉₇ mutante no tóxico, complejo de proteína de la membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis*, la subunidad B de *Escherichia coli* inestable al calor, exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), toxina de cólera B-(CTB), toxina de *Pertussis* y hemaglutinina filamentosa, toxina *Shiga*, y la familia LTB de toxinas bacterianas.
- 25 En otra realización más, X puede ser una lectina. Los ejemplos no limitantes de lectinas adecuadas pueden incluir la subunidad de ricina-B, abrina y lectina de guisante dulce.
- 30 En una ubicación alternativa, X se puede seleccionar entre el grupo que comprende nucleoproteína de retrovirus (retro NP), ribonucleoproteína de la rabia (RNP de rabia), virus de plantas (por ejemplo, TMV, virus del mosaico de judía de ojo negro y de coliflor), proteína de nucleocápside del virus de la estomatitis vesicular (VSV-N), subunidades de virus de la viruela y subunidades del virus del bosque de Semliki.
- 35 En otra realización alternativa, X puede ser un vehículo molecular artificial. Los ejemplos no limitantes de un vehículo molecular artificial incluyen péptidos multiantigénicos (MAP) y microsferas. En una realización adicional X pueden ser partículas similares al virus de la levadura (VLP). En otra realización adicional, X puede ser un antígeno de proteína de malaria.
- 40 Además, X se puede seleccionar entre el grupo que comprende vacunas de Difteria, Tétanos, y Pertussis o componentes de las mismas; vacunas del virus de la polio y componentes de la misma; vacunas de Rubeola, Paperas y Sarampión o componentes de las mismas; vacunas de Hepatitis (A, B, C, y delta) o componentes de las mismas; vacunas de *Haemophilus* (A y B) o componentes de las mismas; vacunas de vaccinia y viruela o
- 45 componentes de las mismas; y vacunas de varicela-zóster y componentes de las mismas.
- En una realización preferente, X puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable para sujetos humanos. En otras palabras, X debe ser un vehículo que provoque de forma segura una respuesta de anticuerpo en un sujeto. En este contexto, la expresión "de forma segura" significa que el vehículo no induce de forma sustancial una respuesta
- 50 inmunológica que tenga reacción cruzada con una autoproteína, o una proteína ingerida de forma regular. Los ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticamente aceptable es para su uso en sujetos humanos f incluyen toxoide de difteria mutante (CRM₁₉₇) y toxoide del tétanos. En una realización preferente, X puede ser el toxoide

CRM₁₉₇ de difteria. En otra realización preferente, X puede ser toxoide del tétanos.

Para aumentar la respuesta inmunológica inducida con respecto a un compuesto de a hapteno de la invención, por lo general más de un compuesto de hapteno se conjuga con una molécula vehículo individual, X, como se expresan mediante n (es decir, el número de compuestos de hapteno conjugados con X). Hablando en términos generales, n es un número entero mayor o igual que 3. En una realización, n puede ser 3, 4 o 5. En otra realización, n puede ser 6, 7, 8, o 9. En otra realización más, n puede ser 10, 11, 12, o 13 o superior. En una realización a modo de ejemplo, n es mayor o igual que 5.

10 En un ejemplo comparativo, un compuesto de hapteno que corresponde a la fórmula (II) se conjuga a través de L a una molécula vehículo, X, para formar un compuesto que tiene la fórmula (VII):

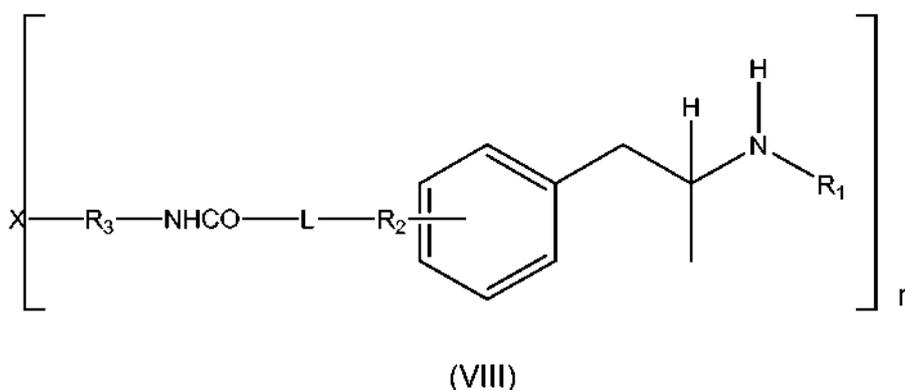


15 en la que:

R₁, L, n, y X son como se ha descrito para compuestos que corresponden a la fórmula (VI); y R₃ se puede seleccionar entre el grupo que comprende un enlace directo, hidrocarbilo, e hidrocarbilo sustituido.

20 En un ejemplo comparativo, R₃ puede ser un enlace directo. En otra realización alternativa, R₃ puede ser un hidrocarbilo. En un ejemplo comparativo, R₃ puede ser un hidrocarbilo sustituido. En un ejemplo comparativo, R₃ puede ser (CH₂)₄ o (CH₂)₄NHCO(CH₂)₅.

En un ejemplo comparativo, un compuesto de hapteno que corresponde a la fórmula (III) se conjuga a través de L a una molécula vehículo, X, para formar un compuesto que tiene la fórmula (VIII):



en la que:

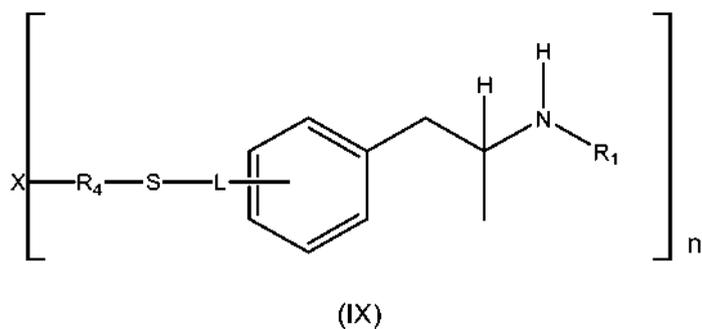
30

R₁, L, n, y X son como se ha descrito para compuestos que corresponden a la fórmula (VI); R₂ es como se ha descrito para compuestos que corresponden a la fórmula (III); y R₃ se puede seleccionar entre el grupo que comprende un enlace directo, hidrocarbilo, e hidrocarbilo sustituido. En una alternativa a modo de ejemplo de la presente realización, R₃ es (CH₂)₄ o (CH₂)₄NHCO(CH₂)₅.

35

En una realización, un compuesto de hapteno que corresponde a la fórmula (IV) se conjuga a través de L a una

molécula vehículo, X, para formar un compuesto que tiene la fórmula (IX):

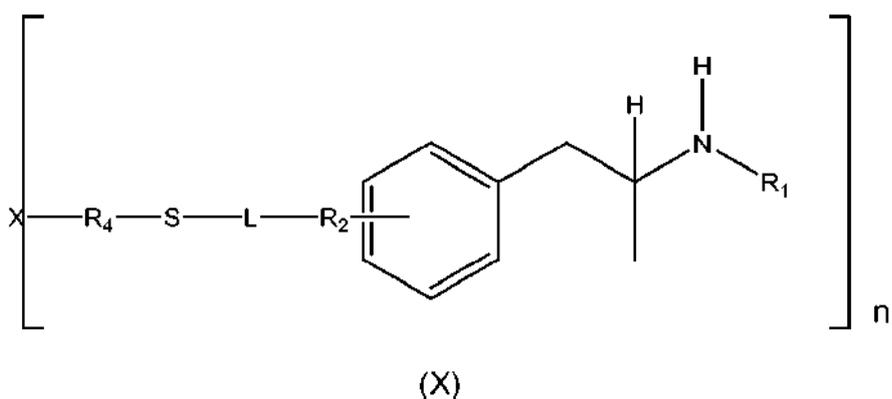


5 en la que:

R_1 , L, n, y X son como se ha descrito para compuestos que corresponden a la fórmula (VI); y R_4 se puede seleccionar entre el grupo que comprende un enlace directo, hidrocarbilo, e hidrocarbilo sustituido.

10 En una alternativa de la presente realización, R_4 puede ser un enlace directo. En otra alternativa de la presente realización, R_4 puede ser un hidrocarbilo. Además, en otra alternativa de la presente realización, R_4 puede ser un hidrocarbilo sustituido. En una alternativa a modo de ejemplo de la presente realización, R_4 puede ser [N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato.

15 En un ejemplo comparativo, un compuesto de hapteno que corresponde a la fórmula (V) se conjuga a través de L a una molécula vehículo, X, para formar un compuesto que tiene la fórmula (X):



20 en la que:

R_1 , R_4 , L, n, y X son como se ha descrito para compuestos que corresponden a la fórmula (VIII) y (IX); y R_2 es como se ha descrito para compuestos que corresponden a la fórmula (III).

25 Los compuestos que tienen las fórmulas (VI), (VII), (VIII), (IX), y (X) se muestran en la Tabla B.

TABLE B

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
$-(CH_2)_{11} COOH$	Para	KLH

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
$-(CH_2)_{11} COOH$	Para	Difteria CRM ₁₉₇

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-(CH ₂) ₁₁ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₁ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₁ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₁ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₂ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₃ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₄ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₅ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₆ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₇ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₈ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₉ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₉ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₉ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₉ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₉ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₉ COOH	Meta	Toxoide del tétanos

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-(CH ₂) ₂₀ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₀ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₀ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₀ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₀ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₀ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₁ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₁ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₁ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₁ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₁ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₁ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₂ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₂ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₂ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₂ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₂ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₂ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₃ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₃ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₃ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₃ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₃ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₃ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₄ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₄ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₄ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₄ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₄ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₄ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₅ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₅ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₅ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₅ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₅ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₅ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₆ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₆ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₆ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₆ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₆ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₆ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₇ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₇ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₇ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₇ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₇ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₇ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₈ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₈ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₈ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₈ COOH	Meta	KLH

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-(CH ₂) ₂₈ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₈ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₉ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₉ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₉ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₉ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₉ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₉ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₃₀ COOH	Para	KLH
-(CH ₂) ₃₀ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₃₀ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₃₀ COOH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₃₀ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₃₀ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₇ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₇ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₈ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₈ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₉ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₉ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₉ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₀ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₀ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₀ SH @	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₁ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₁ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₁ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₁ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₁ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₁ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₂ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₂ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₂ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₂ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₂ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₂ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₃ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₃ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-(CH ₂) ₁₃ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₃ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₃ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₃ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₄ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₄ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₄ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₄ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₄ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₄ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₅ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₅ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₅ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₅ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₅ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₅ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₆ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₆ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₆ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₆ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₆ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₆ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₇ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₇ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₈ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₈ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₉ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₁₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₁₉ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₁₉ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₁₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₀ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₀ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₀ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₁ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₁ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₁ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₁ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₁ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₁ SH	Meta	Toxoide del tétanos

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-(CH ₂) ₂₂ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₂ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₂ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₂ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₂ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₂ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₃ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₃ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₃ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₃ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₃ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₃ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₄ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₄ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₄ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₄ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₄ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₄ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₅ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₅ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₅ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₅ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₅ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₅ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₆ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₆ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₆ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₆ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₆ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₆ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₇ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₇ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₈ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₈ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₉ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₂₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₂₉ SH	Meta	KLH
-(CH ₂) ₂₉ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₂₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₃₀ SH	Para	KLH
-(CH ₂) ₃₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₃₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
-(CH ₂) ₃₀ SH	Meta	KLH

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-(CH ₂) ₃₀ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-(CH ₂) ₃₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₀ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₁ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₂ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₃ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₄ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₅ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₆ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₇ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₈ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₉ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₀ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₁ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₂ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₃ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₄ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₅ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₆ COOH	Meta	Toxoide del tétanos

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₇ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₈ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₉ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₃₀ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₆ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₆ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₆ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₆ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₆ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₆ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₇ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₇ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₈ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₈ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₉ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₉ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₉ SH @	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Meta	KLH

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₁ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₂ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₃ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₄ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₅ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₆ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₁₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₁ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₂ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₃ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₄ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₅ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₆ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₂₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Para	KLH
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Meta	KLH
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
-O(CH ₂) ₃₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₁ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₁ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₁ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₁ COOH	Meta	KLH
‡-X ₁₁ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₁ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₂ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₂ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₂ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₂ COOH	Meta	KLH
‡-X ₁₂ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₂ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₂ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₃ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₃ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₃ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₃ COOH	Meta	KLH
‡-X ₁₃ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₃ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₄ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₄ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₄ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₄ COOH	Meta	KLH
‡-X ₁₄ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₄ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₅ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₅ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₅ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₅ COOH	Meta	KLH
‡-X ₁₅ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₅ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₆ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₆ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₆ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₆ COOH	Meta	KLH

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
‡-X ₁₆ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₆ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₇ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₇ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₇ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₇ COOH	Meta	KLH
‡-X ₁₇ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₇ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₈ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₈ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₈ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₈ COOH	Meta	KLH
‡-X ₁₈ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₈ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₉ COOH	Para	KLH
‡-X ₁₉ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₉ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₉ COOH	Meta	KLH
‡-X ₁₉ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₉ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₀ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₀ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₀ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₀ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₀ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₀ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₁ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₁ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₁ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₁ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₁ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₁ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₂ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₂ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₂ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₂ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₂ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₂ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₃ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₃ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₃ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₃ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₃ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₃ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₄ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₄ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₄ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₄ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₄ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₄ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₅ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₅ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
‡-X ₂₅ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₅ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₅ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₅ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₇ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₇ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₇ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₇ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₇ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₇ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₈ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₈ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₈ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₈ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₈ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₈ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₉ COOH	Para	KLH
‡-X ₂₉ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₉ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₉ COOH	Meta	KLH
‡-X ₂₉ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₉ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₃₀ COOH	Para	KLH
‡-X ₃₀ COOH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₃₀ COOH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₃₀ COOH	Meta	KLH
‡-X ₃₀ COOH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₃₀ COOH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₇ SH	Para	KLH
‡-X ₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₇ SH	Meta	KLH
‡-X ₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₈ SH	Para	KLH
‡-X ₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₈ SH	Meta	KLH
‡-X ₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₉ SH	Para	KLH
‡-X ₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₉ SH	Meta	KLH
‡-X ₉ SH @	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₀ SH	Para	KLH
‡-X ₁₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₀ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₀ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
‡-X ₁₁ SH	Para	KLH
‡-X ₁₁ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₁ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₁ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₁ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₁ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₂ SH	Para	KLH
‡-X ₁₂ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₂ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₂ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₂ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₂ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₃ SH	Para	KLH
‡-X ₁₃ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₃ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₃ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₃ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₃ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₄ SH	Para	KLH
‡-X ₁₄ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₄ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₄ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₄ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₄ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₅ SH	Para	KLH
‡-X ₁₅ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₅ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₅ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₅ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₅ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₆ SH	Para	KLH
‡-X ₁₆ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₆ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₆ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₆ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₆ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₇ SH	Para	KLH
‡-X ₁₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₇ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₈ SH	Para	KLH
‡-X ₁₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₈ SH	Meta	KLH
‡-X ₁₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₉ SH	Para	KLH
‡-X ₁₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₁₉ SH	Meta	KLH

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
‡-X ₁₉ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₁₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₀ SH	Para	KLH
‡-X ₂₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₀ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₀ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₁ SH	Para	KLH
‡-X ₂₁ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₁ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₁ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₁ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₁ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₂ SH	Para	KLH
‡-X ₂₂ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₂ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₂ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₂ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₂ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₃ SH	Para	KLH
‡-X ₂₃ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₃ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₃ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₃ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₃ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₄ SH	Para	KLH
‡-X ₂₄ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₄ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₄ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₄ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₄ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₅ SH	Para	KLH
‡-X ₂₅ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₅ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₅ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₅ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇

Grupo L	Posición en el anillo	Portador
‡-X ₂₅ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₆ SH	Para	KLH
‡-X ₂₆ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₆ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₆ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₆ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₆ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₇ SH	Para	KLH
‡-X ₂₇ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₇ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₇ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₇ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₇ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₈ SH	Para	KLH
‡-X ₂₈ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₈ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₈ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₈ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₈ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₉ SH	Para	KLH
‡-X ₂₉ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₉ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₂₉ SH	Meta	KLH
‡-X ₂₉ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₂₉ SH	Meta	Toxoide del tétanos
‡-X ₃₀ SH	Para	KLH
‡-X ₃₀ SH	Para	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₃₀ SH	Para	Toxoide del tétanos
‡-X ₃₀ SH	Meta	KLH
‡-X ₃₀ SH	Meta	Difteria CRM ₁₉₇
‡-X ₃₀ SH	Meta	Toxoide del tétanos

‡ en donde X puede ser cualquier átomo seleccionado del grupo que comprende C, O, N, P y S; incluyendo el número de hidrógenos adecuado para el balance de carga.

@ en donde L = L⁷-S-R4

III. Química de Conjugación

- 5 Los compuestos detallados en la parte (II) que corresponde a las fórmulas (VI), (VII), (VIII), (IX), y (X) se pueden preparar mediante una diversidad de métodos conocidos generalmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Independientemente del proceso utilizado para la conjugación de un compuesto de hapteno a una molécula vehículo (X) a través de un conector (L), el proceso seleccionado por lo general dará como resultado un compuesto que tenga una densidad de epitopo relativamente elevada, es decir, el número de compuestos de hapteno conjugados con una sola molécula de molécula vehículo, (X), tal como se ha expresado anteriormente n. El método de conjugación usado dependerá de la química de acoplamiento de un compuesto de hapteno en particular a un vehículo molecular. En general, un sitio reactivo en un primer compuesto se une a un sitio reactivo en un segundo compuesto, usando un agente de acoplamiento cocatalizador. A continuación se describen dos procesos a modo de ejemplo.
- 10
- 15 Haciendo referencia a la figura 9, en un ejemplo comparativo para formar compuestos que tienen la fórmula (VII) o (VIII) el compuesto de hapteno se puede conjugar a través del conector (L) a una molécula vehículo (X) mediante formación de un enlace amida. Hablando en términos generales, el grupo carboxilo del conector reacciona con un grupo amida en la molécula vehículo. Sin embargo, en ciertos ejemplos comparativos, el grupo carboxilo del conector puede reaccionar con un segundo conector que reacciona con un grupo amida en la molécula vehículo. Tales segundos conectores pueden ser conectores homobifuncionales o heterobifuncionales, y se conocen bien en la técnica. Los agentes de acoplamiento adecuados pueden incluir EDC, Carbodiimida-HCL, glutaraldehído y otros
- 20

agentes similares. En un ejemplo comparativo, L de fórmula (II) o (III) se puede conjugar con X por reacción con EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]carbodiimida) (véase la figura 9). Como alternativa, X puede reaccionar con TFCS, y a continuación reaccionar con EDC para formar un enlace amida con L de fórmula (II) o (III) (véase la figura 9).

5

Por lo general, en una reacción de conjugación, es decir una reacción de síntesis, que se basa en un enlace amida, la proporción de molécula vehículo con respecto a compuesto de hapteno puede ser entre aproximadamente 1:25 y aproximadamente 1:100. En una realización, la proporción puede ser entre aproximadamente 1:25 y aproximadamente 1:50. En otra realización, la proporción puede ser entre aproximadamente 1:50 y aproximadamente 1:75. En otra realización más, la proporción puede ser entre aproximadamente 1:75 y aproximadamente 1:100. Además, en otra realización, la proporción puede ser entre aproximadamente 1:30 y aproximadamente 1:90.

Hablando en términos generales, la proporción de molécula vehículo con respecto a compuesto de hapteno para una reacción de conjugación se debería determinar para maximizar el número de compuestos de hapteno conjugados con el vehículo molecular (es decir n, como se ha descrito en las fórmulas (VI), (VII), y (VIII)). Por lo general, n es un número entero mayor o igual que 3; n puede ser 3, 4 o 5; n puede ser 6, 7, 8, o 9; y n puede ser 10, 11, 12, o 13 o superior. En un ejemplo comparativo, n es mayor o igual que 5. La proporción de molécula vehículo con respecto a compuesto de hapteno se puede determinar mediante MALDI MS.

20

Haciendo referencia a la Figura 10, en una realización a modo de ejemplo para formar compuestos que tienen la fórmula (IX) o el ejemplo comparativo (X), el compuesto de hapteno se puede conjugar a través del conector (L) con una molécula vehículo (X) mediante la formación de un enlace de sulfuro. Hablando en términos generales, el grupo sulfuro del conector reacciona con un grupo activo en la molécula vehículo. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el grupo sulfuro del conector puede reaccionar con un segundo conector que reacciona con un grupo activo en la molécula vehículo. Tales segundos conectores pueden ser conectores homobifuncionales o heterobifuncionales, y se conocen bien en la técnica. Un ejemplo de un grupo activo a modo de ejemplo en la molécula vehículo es la maleimida. Por ejemplo, X se puede inactivar con Sulfo-SMCC, y a continuación reaccionar con un compuesto de fórmula (IV) o el ejemplo comparativo (V) para formar un enlace de sulfuro (véase la figura 9).

25

Por lo general, en una reacción de conjugación, es decir una reacción de síntesis, que se basa en un enlace de sulfuro, la proporción de molécula vehículo con respecto a compuesto de hapteno puede ser entre aproximadamente 1:25 y aproximadamente 1:100. En una realización, la proporción puede ser entre aproximadamente 1:25 y aproximadamente 1:50. En otra realización, la proporción puede ser entre aproximadamente 1:50 y aproximadamente 1:75. En otra realización más, la proporción puede ser entre aproximadamente 1:75 y aproximadamente 1:100. Además, en otra realización, la proporción puede ser entre aproximadamente 1:30 y aproximadamente 1:90.

30

La proporción de molécula vehículo con respecto a compuesto de hapteno se debería seleccionar para maximizar el número de compuestos de hapteno conjugados con el vehículo molecular (es decir n, como se ha descrito en las fórmulas (VI), (IX), y (X)). Por lo general, n es un número entero mayor o igual que 3. En una realización, n puede ser 3, 4 o 5. En otra realización, n puede ser 6, 7, 8, o 9. En otra realización más, n puede ser 10, 11, 12, o 13 o superior. En una realización a modo de ejemplo, n es mayor o igual que 5. La proporción de molécula vehículo con respecto a compuesto de hapteno se puede determinar mediante MALDI MS.

40

IV. Composiciones Inmunogénicas Que Comprenden Compuestos de Hapteno

Un aspecto adicional de la invención incluye una composición inmunogénica que comprende un compuesto de hapteno de fórmula (IV) o (IX). En algunos ejemplos comparativos, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en un compuesto de fórmula (I), un compuesto de fórmula (II), un compuesto de fórmula (III), un compuesto de fórmula (V), un compuesto de fórmula (VI), un compuesto de fórmula (VII), un compuesto de fórmula (VIII), y un compuesto de fórmula (X). En un ejemplo comparativo, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (I). En un ejemplo comparativo, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (II). En un ejemplo comparativo, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (III). En una realización, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (IV). En un ejemplo comparativo, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (V). En un ejemplo comparativo, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (VI). En un ejemplo comparativo, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (VII). En un ejemplo comparativo la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (VIII). En una realización, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (IX). En un ejemplo comparativo, la composición inmunogénica puede comprender un compuesto de fórmula (X).

En ciertos aspectos una composición inmunogénica que comprende un compuesto de hapteno de la invención puede comprender adicionalmente un adyuvante. Hablando en términos generales, un adyuvante se puede usar para aumentar la respuesta inmunológica a un compuesto de hapteno de la invención. Por ejemplo, un adyuvante se

65

puede usar para aumentar la afinidad de anticuerpo, título de anticuerpo y la duración de la respuesta inmunológica en un sujeto. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes pueden incluir alum, TiterMax Gold, Ribí, ASO4, adyuvante completo de Freund, y adyuvante incompleto de Freund. En un aspecto el adyuvante puede ser alum. En otra realización, el adyuvante puede ser TiterMax Gold. En otro aspecto más el adyuvante puede ser Ribí. Además, en otra realización, el adyuvante puede ser ASO4. Además, en otro aspecto más el adyuvante puede ser adyuvante completo de Freund. En un aspecto adicional el adyuvante puede ser adyuvante incompleto de Freund. En un aspecto a modo de ejemplo el adyuvante es farmacéuticamente aceptable para su uso en un sujeto humano. Hablando en términos generales, un adyuvante farmacéuticamente aceptable esta libre de pirógenos y no inducirá un shock anafiláctico en un sujeto. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes farmacéuticamente aceptables para su uso en seres humanos incluyen alum y que ASO4.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica que comprende un compuesto de hapteno puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, como se ha descrito anteriormente en la sección II. En resumen, un vehículo farmacéuticamente aceptable induce de forma segura una respuesta de anticuerpo en un sujeto. En este contexto, de forma segura se refiere a que el vehículo no induce sustancialmente una respuesta inmunológica que tenga reacción cruzada con una autoproteína, o una proteína ingerida de forma regular del sujeto. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una toxina bacteriana o un toxoide bacteriano. En otra realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un toxoide de difteria mutante, por ejemplo, CRM₁₉₇. En otra realización más, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser toxoide del tétanos.

En ciertos aspectos se prevé que un vehículo molecular en particular se pueda conjugar con más de un tipo de compuesto de hapteno. Por ejemplo, un vehículo molecular en particular se prevé conjugar con un compuesto de hapteno de fórmula (II) y de fórmula (IV). Como alternativa, un vehículo molecular en particular se puede conjugar con al menos dos compuestos de hapteno enumerados en la Tabla A.

En aspectos adicionales, una composición inmunogénica que comprende un compuesto de hapteno puede comprender adicionalmente un adyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, una composición inmunogénica de la invención puede comprender una combinación de un adyuvante y vehículo enumerados en la Tabla C.

TABLA C	
Adyuvante	Vehículo
alum	CRM ₁₉₇ de Difteria
alum	Toxoide del Tétanos
alum	KLH
Titermax gold	CRM ₁₉₇ de Difteria
Titermax gold	Toxoide del Tétanos
Titermax gold	KLH
ASO4	CRM ₁₉₇ de Difteria
ASO4	Toxoide del Tétanos
ASO4	KLH
Ribi	CRM ₁₉₇ de Difteria
Ribi	Toxoide del Tétanos
Ribi	KLH
Adyuvante completo de Freund	CRM ₁₉₇ de Difteria
Adyuvante completo de Freund	Toxoide del Tétanos
Adyuvante completo de Freund	KLH
Adyuvante incompleto de Freund	CRM ₁₉₇ de Difteria
Adyuvante incompleto de Freund	Toxoide del Tétanos
Adyuvante incompleto de Freund	KLH

En una realización alternativa, una composición inmunogénica que comprende un compuesto de hapteno puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitantes de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen agua estéril, soluciones de sal tales como solución salina, fosfato sódico, cloruro sódico, alcohol, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes de bencilo, polietilenglicol, gelatina, manitol, 5 carbohidratos, estearato de magnesio, parafina viscosa, ésteres de ácido graso, hidroximetil celulosa, y tampón. Los expertos en esa materia pueden usar otros excipientes adecuados.

V. Provocar una Respuesta Inmune

10 Otro aspecto adicional incluye administrar un compuesto de hapteno a un sujeto para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto. Por lo general, tal respuesta inmunológica generará anticuerpos específicos que reconozcan uno o más de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y (+)MDMA. En un aspecto los anticuerpos específicos pueden reconocer dos compuestos del el grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y (+)MDMA. En una realización a modo de ejemplo, los anticuerpos específicos pueden reconocer los tres compuestos del grupo 15 que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y (+)MDMA. En otra realización a modo de ejemplo, los anticuerpos específicos pueden reconocer los tres compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y (+)MDMA, y no reaccionan en forma cruzada sustancialmente con (-)metanfetamina, (-)anfetamina, y (-)MDMA. Además, en otra realización a modo de ejemplo, los anticuerpos específicos pueden reconocer los tres compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y (+)MDMA, y no reaccionan en forma 20 cruzada sustancialmente con medicamentos sin receta médica.

En una realización, la respuesta inmunológica inducida puede generar anticuerpos específicos para un compuesto de (IV) o (IX) administrados a un sujeto. En ejemplos comparativos, un método para generar anticuerpos específicos para un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en un compuesto de fórmula (I), un compuesto de 25 fórmula (II), un compuesto de fórmula (III), un compuesto de fórmula (V), un compuesto de fórmula (VI), un compuesto de fórmula (VII), un compuesto de fórmula (VIII), y un compuesto de fórmula (X) puede comprender la administración del compuesto a un sujeto. En otro aspecto la respuesta inmunológica inducida puede generar anticuerpos específicos para más de un compuesto de hapteno de la invención administrados a un sujeto. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (II) y un compuesto de fórmula (IV) se pueden administrar a un sujeto de forma 30 simultánea, de forma sincronizada, o de forma secuencial. Como alternativa, más de un compuesto enumerado en la Tabla A se puede administrar a un sujeto de forma simultánea, de forma sincronizada, o de forma secuencial.

Como se usa en el presente documento, sujeto se refiere a cualquier vertebrado capaz de remontar una respuesta inmunológica. En una realización, un sujeto puede ser un roedor. Los ejemplos no limitantes de roedores incluyen 35 ratones y ratas. En otra realización, un sujeto puede ser un animal de ganado. Los ejemplos no limitantes de animales de ganado incluyen vacas, cerdos, ovejas, cabras, llamas y aves de corral. Además, en otra realización, un sujeto puede ser un animal de compañía. Los ejemplos no limitantes de animales de compañía incluyen perros, gatos, conejos y caballos. En una realización adicional, un sujeto puede ser un primate. Los ejemplos no limitantes de los primates incluyen lémures, monos, simios y seres humanos. En una realización más, un sujeto puede ser un 40 primate no humano. En una realización alternativa, un sujeto puede ser un ser humano.

En cada una de las realizaciones mencionadas anteriormente, los sujetos pueden ser sujetos que usan (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y/o (+)MDMA (y/o éxtasis). Como alternativa, los sujetos pueden estar en riesgo de uso de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y/o (+)MDMA (y/o éxtasis). En otra alternativa, los sujetos se ponen está 45 recuperando del uso de (+) metanfetamina, (+)anfetamina, y/o (+)MDMA (y/o éxtasis). Además, en otra alternativa los sujetos pueden estar intentando dejar el uso de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y/o (+)MDMA (y/o éxtasis) bajo supervisión médica.

Un experto en la materia observará que un compuesto de hapteno de la invención se puede administrar en una 50 diversidad de maneras de inducir una respuesta inmunológica. (Véase por lo general, Herbert y Fristensen (1986) y Poole (1987)). Hablando en términos generales, el método de administración dependerá del volumen de la composición administrada, de la solubilidad de la composición y de la velocidad de la respuesta inmunológica deseada. Además, el método de administración puede estar limitado por el sujeto implicado. Por lo general, se debería elegir un método de administración que proporcionara un aumento del título de anticuerpos, afinidad y 55 duración de la respuesta de anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de los posibles métodos de administración incluyen administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular y administración intradérmica. En una realización, una composición que comprende un compuesto de hapteno de la invención se puede administrar por vía subcutánea. En otra realización, una composición se puede administrar por vía intraperitoneal. En otra realización más, una composición se puede administrar por vía 60 intravenosa. Además, en otra realización, una composición se puede administrar por vía intramuscular. En otra realización más, una composición se puede administrar por vía intradérmica.

La dosificación del compuesto de hapteno administrado variará por lo general con el sujeto implicado. Hablando en términos generales, en la formulación de una dosificación que se va a administrar, un experto en la materia debería 65 considerar el peso del sujeto y el método de administración. Además, la dosificación se puede seleccionar para

aumentar el título de anticuerpo, afinidad de anticuerpo, y/o duración de la respuesta de anticuerpos. Por ejemplo, una dosificación elevada puede conducir a anticuerpos con títulos más altos, pero a anticuerpos de afinidad más baja. En una realización, la dosificación usada puede ser la dosis más baja posible para generar una respuesta de anticuerpos en al menos un 70 % de los sujetos implicados. En otra realización, la dosificación usada puede ser la dosis más baja posible para generar una respuesta de anticuerpos en al menos un 75 %, 80 %, 85 %, o un 90 % de los sujetos implicados. En otra realización más, la dosificación usada puede ser la dosis más baja posible para generar una respuesta de anticuerpos en al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de los sujetos implicados. En otra realización más, la dosificación usada puede ser la dosis más baja posible para generar una respuesta de anticuerpos en un 100 % de los sujetos implicados. Los ejemplos no limitantes de dosificaciones específicas para diversos sujetos se pueden encontrar en los ejemplos.

El programa de administración también se debería elegir, hablando en términos generales, para aumentar el título de anticuerpos, afinidad de anticuerpos y la duración de la respuesta inmunológica. Por ejemplo, a un sujeto se le podría administrar inicialmente un compuesto de hapteno de la invención, y a continuación recibir administraciones de refuerzo a partir de ese momento. La frecuencia y el número de administraciones de refuerzo pueden variar dependiendo del sujeto implicado. Las administraciones frecuentes pueden aumentar el título, pero no la afinidad. Como alternativa, las administraciones menos frecuentes pueden dar como resultado un aumento de la afinidad. Por ejemplo, en seres humanos, un programa puede incluir administraciones de refuerzo durante uno o más años después de la administración inicial. Los ejemplos no limitantes de programas de refuerzo se pueden encontrar en los ejemplos.

VI. Usos para los Anticuerpos Específicos

Un aspecto adicional incluye usos tanto terapéuticos como no terapéuticos para los anticuerpos específicos generados usando los métodos de la sección V mencionada anteriormente.

En ciertos aspectos los anticuerpos específicos se pueden usar en ensayos no terapéuticos, tales como inmunotinción, inmunoprecipitación, inmunotransferencia, purificación mediante inmunoafinidad, y los ELISA. En un aspecto los anticuerpos específicos se pueden usar para inmunotinción. En otro aspecto los anticuerpos específicos se pueden usar para inmunoprecipitación. En otro aspecto más los anticuerpos específicos se pueden usar para inmunotransferencia. Además, en otro aspecto los anticuerpos específicos se pueden usar para purificación mediante inmunoafinidad. Además, en otro aspecto los anticuerpos específicos se pueden usar para los ELISA. Los protocolos para cada uno de los usos no terapéuticos mencionados anteriormente se conocen bien en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en Harlow y Lane, *Antibodies*, Cold Spring Harbor, 1988, Capítulos 9-14.

Además, los anticuerpos específicos se pueden usar con fines terapéuticos. Hablando en términos generales, los anticuerpos específicos se pueden usar para antagonizar los efectos de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y/o (+)MDMA en un sujeto. En ciertas realizaciones, los sujetos pueden estar usando (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y/o (+)MDMA. Por ejemplo, en un aspecto, los anticuerpos específicos pueden antagonizar los efectos de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, y/o (+)MDMA en un sujeto disminuyendo la concentración de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA en el cerebro de un sujeto. En otro aspecto los anticuerpos específicos se pueden usar para disminuir el comportamiento de búsqueda de fármaco en un sujeto. En otro aspecto más los anticuerpos específicos se pueden usar para disminuir el comportamiento de autodosificación en un sujeto.

En cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, los anticuerpos específicos se pueden administrar de forma pasiva, de forma activa, o en una combinación de administración pasiva y activa. Por lo general, la administración activa se refiere a la administración de un compuesto de hapteno de la invención a un sujeto para que el sujeto genere anticuerpos *in vivo*. Por lo general, la administración pasiva se refiere a la administración de al menos un anticuerpo específico, generado por un primer sujeto o producido a través de métodos *ex vivo*, en un segundo sujeto.

En un aspecto la invención puede incluir un método para tratar el uso de fármacos. El método puede comprender inducir una respuesta inmune en un sujeto que usar fármacos mediante la administración de una composición de hapteno a un sujeto, en la que la respuesta inmunológica disminuye la concentración de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA en el cerebro del sujeto.

DEFINICIONES

Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen una serie de términos:

Como se usa en el presente documento "(d)" representa dextrógiro y "(l)" representa levógiro, y se refiere a la dirección en la que un enantiómero gira el plano de luz polarizada. En el presente documento, "(d)" se usa indistintamente con "(+)", y "(l)" se usa indistintamente con "(-)".

A menos que se indique de otro modo, los grupos alquilo que se describen en el presente documento son

preferentemente alquilo inferior que contiene de uno a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 30 átomos de carbono o más. Pueden ser de cadena lineal o ramificada o cíclicos e incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, hexilo y similares. A menos que se indique de otro modo, los grupos alquenoilo que se describen en el presente documento son preferentemente alquenoilo inferior que contiene de dos a ocho átomos de carbono en la

5 cadena principal y hasta 30 átomos de carbono o más. Pueden ser de cadena lineal o ramificada o cíclicos e incluyen etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, hexenilo, y similares.

A menos que se indique de otro modo, los grupos alquínilo que se describen en el presente documento son preferentemente alquínilo inferior que contiene de dos a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 30

10 átomos de carbono o más. Pueden ser de cadena lineal o ramificada e incluyen etinilo, propinilo, butinilo, isobutinilo, hexinilo, y similares.

Como se usa en el presente documento, anticuerpo por lo general se refiere a un polipéptido o proteína que reconoce y se puede unir a un epítipo de un antígeno. Un anticuerpo, como se usa en el presente documento,

15 puede ser un anticuerpo completo como se entiende en la técnica, es decir, que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, o se puede seleccionar entre un grupo que comprende anticuerpos policlonales, ascitis, fragmentos de Fab, fragmentos de Fab', anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, y un péptido que comprende una región hipervariable y/o marco conservada de un anticuerpo.

20 Como se usa en el presente documento, afinidad de anticuerpo se refiere a la atracción entre un anticuerpo y un epítipo diana. La afinidad se puede medir calculando un valor de K_D para un anticuerpo en particular y un epítipo en particular. Por lo general, la afinidad se puede igualar con $(1/K_D)$. " K_D ", como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación. Los métodos para calcular los valores de K_D se conocen bien en la técnica.

25 Como se usa en el presente documento, título de anticuerpo se refiere a la concentración de anticuerpos presentes en la dilución más elevada de una muestra de suero que inhibe la unión de ligandos diana en un 50 %. El título se puede medir usando un ensayo de ELISA o RIA, mediante métodos conocidos comúnmente en la técnica.

30 Los términos "arilo" o "ar", como se usan en el presente documento, solos o como parte de otro grupo, indican grupos aromáticos homocíclicos opcionalmente sustituidos, preferentemente grupos monocíclicos o bicíclicos que contienen de 6 a 12 carbonos en la porción del anillo, tales como fenilo, bifenilo, naftilo, fenilo sustituido, bifenilo sustituido o naftilo sustituido. El arilo más preferente es fenilo y fenilo sustituido.

35 El término "conjugado" se refiere a una sustancia formada a partir de la unión en conjunto de dos partes. Los conjugados representativos de acuerdo con la presente invención incluyen los formados mediante la unión en conjunto de una molécula pequeña y una molécula grande, tal como una proteína. La metanfetamina unida a una proteína vehículo a través de un conector es un ejemplo de conjugación.

40 El término "contiguo" se usa en el presente documento para describir el número de átomos que forman un conector. El número de átomos en un grupo de unión o conector se determina mediante el recuento de los átomos contiguos que no son hidrógeno. En el presente contexto, "contiguo" es el número de átomos en una cadena dentro de un grupo de unión determinado por el recuento del número de átomos que no son hidrógeno junto con la ruta más corta entre las sub estructuras que se están conectando.

45 La expresión "disminuir la concentración de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA en el cerebro" puede hacer referencia a cualquiera de disminuir la cantidad de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA en el cerebro, o a cambiar la tasa de entrada de (+)metanfetamina, (+)anfetamina, o (+)MDMA en el cerebro.

50 El término "derivado" se refiere a un compuesto o molécula químicos preparados a partir de un compuesto precursor mediante una o más reacciones químicas.

El término "hapteno" se refiere a un antígeno parcial o incompleto. Los haptenos son sustancias sin proteínas que por lo general no son capaces de estimular la formación de anticuerpos, pero pueden reaccionar con anticuerpos. La

55 anfetamina, metanfetamina, y sus derivados son haptenos.

Los términos "heterociclo" o "heterocíclico", como se usan en el presente documento, solos o como parte de otro grupo indican grupos aromáticos o no aromáticos opcionalmente sustituidos, totalmente saturados o insaturados, monocíclicos o bicíclicos, que tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo, y preferentemente 5 o 6

60 átomos en cada anillo.

El grupo heterociclo tiene preferentemente 1 o 2 átomos de oxígeno, 1 o 2 átomos de azufre, y/o de 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo, y se puede unir al resto de la molécula a través de un carbono o heteroátomo. Los grupos heterociclo a modo de ejemplo incluyen heteroaromáticos tales como furilo, tienilo, piridilo, oxazolilo, pirrolilo, indolilo,

65 quinolinilo, o isoquinolinilo y similares. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen uno o más de los siguientes

grupos: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, ceto, hidroxilo, hidroxilo protegido, acilo, aciloxi, alcoxi, alquenoxi, alquinoxio, ariloxi, halógeno, amido, amino, nitro, ciano, tiol, cetales, acetales, ésteres y éteres.

El término "heteroaromático", como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, o representa grupos aromáticos opcionalmente sustituidos que tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo, y preferentemente 5 o 6 átomos en cada anillo. El grupo heteroaromático tiene preferentemente 1 o 2 átomos de oxígeno, 1 o 2 átomos de azufre, y/o de 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo, se puede unir al resto de la molécula a través de un carbono o heteroátomo. Los heteroaromáticos a modo de ejemplo incluyen furilo, tienilo, piridilo, oxazolilo, pirrolilo, indolilo, quinolinilo, o isoquinolinilo y similares. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen uno o más de los siguientes grupos: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, ceto, hidroxilo, hidroxilo protegido, acilo, aciloxi, alcoxi, alquenoxi, alquinoxio, ariloxi, halógeno, amido, amino, nitro, ciano, tiol, cetales, acetales, ésteres y éteres.

Los términos "hidrocarburo" e "hidrocarbilo", como se usan en el presente documento, describen compuestos o radicales orgánicos que consisten exclusivamente en los elementos carbono e hidrógeno. Estos restos incluyen restos de alquilo, alqueno, alquino, y arilo. Estos restos también incluyen restos de alquilo, alqueno, alquino, y arilo sustituidos con otros grupos de hidrocarburo alifático o cíclico, tales como alcarilo, alquenoarilo y alquinarilo.

Como se usa en el presente documento, un "grupo de unión" o "conector" se refiere a una porción de una estructura química que conecta dos o más subestructuras tales como haptenos, vehículos, inmunógenos, etiquetas, indicadores u otros conectores. Un grupo de unión tiene al menos 1 cadena sin interrumpir de átomos que no son hidrógeno (u otros átomos monovalentes) que se extienden entre las subestructuras. Los átomos de un grupo de unión y los átomos de una cadena dentro de un grupo de unión están conectados por sí mismos mediante enlaces químicos. Los conectores pueden ser cadenas de hidrocarbilo o hidrocarbilo sustituido saturado o insaturado, lineal o ramificado.

El término "reconocer", cuando se refiere a un anticuerpo, se refiere a la afinidad del anticuerpo. Hablando en términos generales, para que un anticuerpo "reconozca" múltiples dianas, la afinidad del anticuerpo para cada diana reconocida está al menos dentro de 8 veces de la afinidad del anticuerpo para cada otra diana reconocida. En una realización a modo de ejemplo, la afinidad del anticuerpo para cada diana reconocida está entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4 veces la afinidad del anticuerpo para cada otra diana reconocida.

Los restos de "hidrocarbilo sustituido" que se describen en el presente documento son restos de hidrocarbilo que están sustituidos con al menos un átomo que no es carbono, incluyendo restos a los que un átomo de la cadena de carbono está sustituido con un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno, silicio, fósforo, boro, azufre, o un átomo de halógeno. Estos sustituyentes pueden incluir uno o más de los siguientes grupos: halógeno, carbociclo, carboxi, arilo, heterociclo, alcoxi, alquenoxi, alquinoxio, ariloxi, hidroxilo, hidroxilo protegido, ceto, acilo, aciloxi, nitro, amino, amido, nitro, ciano, tiol, cetales, acetales, ésteres y éteres.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferentes de la invención. Las personas con experiencia en la materia deberían observar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen a continuación representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran diversas realizaciones de la invención.

Ejemplo 1. Diseño de Hapteno y Selección de Anticuerpo.

Cuando se generan anticuerpos monoclonales (mAb, plural y singular) frente a moléculas pequeñas, la composición química y la orientación molecular del hapteno similar a fármaco en el antígeno es un determinante fundamental. Esto es especialmente importante cuando se intenta descubrir mAb terapéuticos frente a los fármacos de adicción (+)-metanfetamina ((+)MET), (+)-anfetamina ((+)AMP) y el compuesto relacionado (+)-3,4-metilendioximetanfetamina ((+)MDMA, el isómero dextrógiro en la mezcla racémica conocido como MDMA o éxtasis). El objetivo de estos estudios era diseñar y sintetizar haptenos similares a (+)MET con atributos estructurales que pudieran hacer los eficaces para generar anticuerpos monoclonales para tratar problemas médicos asociados con estos fármacos de adicción estimulantes.

Para estos estudios, los espaciadores de hapteno entre (+)MET y la proteína vehículo se alargaron progresivamente de 4 a 10 átomos para aumentar el potencial de interacción más elevada del hapteno con el sitio de unión al anticuerpo y/o para aumentar la flexibilidad del espaciador la estructura de la cadena principal de (+)MET y el vehículo. Se hizo la hipótesis de que un alargamiento progresivo y flexibilidad de la podría conducir a un aumento de la afinidad y la especificidad debido a un aumento del acceso a toda la estructura similar a la de (+)MET. Como una estrategia secundaria, la posición de la unión del conector a la estructura de (+)MET (por ejemplo, uniones en para y meta) se varió en un intento para inducir anticuerpos con una selectividad conformacional diferente para compuestos similares a (+)MET.

Compuestos Químicos y Fármacos

5 Todos los compuestos químicos y antígenos de proteína se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO), a menos que se indique de otro modo. Las enzimas y las cepas de *E. coli* se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). (+)-2',6'-³H(n) metanfetamina ([³H]-(+)-MET; 23, 5 Ci/mmol) y (±)-[2,6-³H₂(n)]-anfetamina ([³H]-(+)-AMP; 45 Ci/mmol) se obtuvieron en el National Institute on Drug Abuse (Bethesda, MD) después de su síntesis en el Research Triangle Institute (Research Triangle Park, NC). Otros fármacos similares a MET usados en este estudio también se tuvieron en el National Institute on Drug Abuse.

10

La [³H]-(+)-MET se usó tal como se envió, pero la [³H]-(+)-AMP se separó de forma cromatográfica para obtener [³H]-(+)-AMP para su uso en los estudios de los inventores de especificidad de (+)-AMP. La separación se realizó en una columna CrownPak CR(+) de 150 x 4 mm (i.d.) de 5 μm (Chiral Technologies Inc., Exton, PA). La fase móvil consistía en ácido perclórico 0,1 M (Fisher Scientific) que contenía metanol al 10 % (v/v). La temperatura de la columna se mantuvo a 15 °C. El caudal era de 1,0 ml/min y el volumen de inyección era de 50 μl. Los picos cromatográficos se detectaron usando detección de absorción ultravioleta a una longitud de onda de 210 nm. Los tiempos de retención para [³H]-(+)-AMP y [³H]-(-)-AMP eran 20,1 min y 24,4 min, respectivamente.

Haptenos y conjugación de hapteno-proteína

20

Se sintetizaron cinco haptenos similares a (+)-MET del isómero (+)estereoespecíficos diferentes. Todos los haptenos se sintetizaron como sales de HCl para ayudar en la solubilidad, y se almacenaron como sólidos o como polvos hasta su uso. Las estructuras químicas se muestran en la Tabla 1. La síntesis completa de uno de los haptenos ((+)-MET P6) se informó previamente (Byrnes-Blake *et al.*, 2001, *Int Immunopharmacol* 1: 329-338). También se intentó la síntesis de una molécula de hapteno espaciadora de 8 carbonos, pero se demostró que la síntesis de esta molécula era más difícil de lo esperado, de modo que se pospuso. Los nombres químicos y las abreviaturas de los cinco haptenos son:

- 30 (S)-(+)-4-(3-carboxipropil)metanfetamina, (+)MET P4
 (S)-(+)-4-(5-carboxipentil)metanfetamina, (+)MET P6
 (S)-(+)-4-(5-carboxipentiloxi)metanfetamina, (+)MET P06
 (S)-(+)-3-(5-carboxipentiloxi)metanfetamina, (+)MET M06
 (S)-(+)-3-(9-carboxinoniloxi)metanfetamina, (+)MET M010

35 Inicialmente, cada hapteno se unía covalentemente a al menos 2-3 antígenos de proteína diferentes y se usaba para inmunización de ratones para someter a ensayo la respuesta de IgG anti-MET. El ratón individual y la combinación de hapteno-antígeno de proteína que proporcionaba los títulos más elevados de IgG anti-(+)-MET se eligió para la producción de anticuerpos monoclonales (véanse los detalles a continuación). Lo que sigue a continuación es un listado de los conjugados de hapteno-proteína que producían los mAb enumerados en la tabla 1: (+)MET P4 y (+)MET P6 conjugados con albúmina de suero bovino; (+)MET P06 y (+)MET M06 conjugados con Modulador Inmune Inject Supercarrier (BSA cationizada (cBSA), Pierce Biotech, Rockford, IL); (+)MET M010 conjugada con ovoalbúmina (OVA).

45 Todas las reacciones químicas para unión covalente de los haptenos a antígenos de proteína seguían el mismo procedimiento general. Los haptenos se solubiliza un primero en cualquiera de tampón de ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 0,1 M (pH 4,5) o dimetilformamida y a continuación el pH se ajustó a 4,5 con HCl. Todos los haptenos se acoplaron a sus respectivos antígenos de proteína mediante una reacción de carbodiimida usando el reticulador clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (Pierce Biotech). Esta síntesis química forma un enlace peptídico entre el grupo carboxilo de la rama del conector de hapteno y grupos amino libres de cadenas laterales de lisina en las respectivas proteínas. Las reacciones se realizaron con agitación continua en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 18 h. Al final de la reacción, todos los antígenos se purificaron como se describe en Byrnes-Blake *et al.*, (2003, *Eur J Pharmacol* 461: 119-128). Esta purificación implicaba diálisis frente a agua destilada, solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), y una purificación final de la fracción soluble en una columna de filtración en gel en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Los antígenos purificados se almacenaron a -20 °C hasta que se necesitaron.

Inmunización, Identificación sistemática y generación de hibridoma

Para todas las inmunizaciones se usaron ratones BALB/c hembra (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Para la producción del mAb de (+)MET P6, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea en los cuartos traseros con 100 μg del antígeno (+)MET P6 emulsionado a 1:1 (v/v) en adyuvante TiterMax (CytRx Corporation, Norcross, GA) y se realizó un refuerzo mensualmente con 50 μg del antígeno hasta que se alcanzó un título favorable. Para las demás inmunizaciones con antígeno, los ratones se inmunizaron inicialmente en los cuartos traseros por vía subcutánea en los cuartos traseros con 20-100 μg del antígeno emulsionado en Adyuvante completo de Freund. La inmunización inicial fue seguida de un refuerzo con 20-50 μg del antígeno emulsionado en Adyuvante incompleto de

Freund tres semanas después seguido de tres refuerzos a intervalos de seis semanas, hasta que se alcanzó un nivel de título favorable. Las muestras de suero se tomaron periódicamente a través de extracción de sangre en la cola para medir la IgG anti-(+) MET. Los títulos se midieron mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática) usando placas de microtitulación de 96 pocillos revestidas con el hapteno original conjugado con una proteína diferente. Por ejemplo, si el antígeno original era (+)MET-MO6-cBSA, se usaba (+)MET-MO6 conjugado con tiroglobulina para evitar la selección de anticuerpos reactivos a proteína portadora. La identificación sistemática de la respuesta de IgG anti-(+)MET se realizó mediante un radioinmunoensayo (RIA) de [³H]-(+)-MET, usando (+)MET y (+)AMP como los inhibidores. Después de conseguir los suficientes títulos de IgG anti-(+)MET, se usó tecnología de hibridoma convencional como se ha descrito anteriormente (Valentine *et al.*, 1994, *J Pharmacol Exp Ther* 269: 1079-1085). El compañero de fusión de hibridoma para linfocitos B de ratón fue la línea celular P3X63Ag8.653 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA). El isotipo de IgG y la identidad de la cadena ligera se determinaron con un kit de formación de isotipos de anticuerpos de ratón (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

Producción y purificación

Se produjeron anticuerpos monoclonales en un biorreactor de fibras huecas 2500 de Cell-Pharm System (Valentine *et al.*, 1996, *J Pharmacol Exp Ther* 278: 709-716); Unisyn Technologies, Inc., Hopkinton, MA) o en un bioreactor Biostat B de 10 litros (Sartorius Corp, Edgewood, NY). Todos los anticuerpos se cosecharon y almacenaron a -80 °C hasta su purificación. Los Ab monoclonales se purificaron bien por cromatografía de afinidad usando Proteína G-Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), o cromatografía de intercambio iónico usando SP Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) como se describe en Hardin *et al.*, (1998, *J Pharmacol Exp Ther* 285: 1113-1122), o una combinación de los dos métodos. Después de la purificación, todos los anticuerpos se concentraron y el tampón se intercambió en fosfato sódico 15 mM que contenía cloruro sódico 150 mM (pH 6,5-7,5) como se describe en McMillan *et al.*, (2002, *Behav Pharmacol* 13: 465-473).

Determinación de la especificidad inmunoquímica

Los perfiles de reactividad cruzada de cada mAb para metanfetamina, y compuestos estructuralmente relacionados y no relacionados, se determinaron mediante RIA de una manera similar a la descrita por Owens *et al.*, (1988, *J Pharmacol Exp Ther* 246: 472-478). Un valor de la CI50 para la inhibición de [³H]-(+)-MET (y [³H]-(+)-AMP para el mAb generado frente al hapteno (+)MET MO10) se determinó para cada ligando después de ajustar una curva sigmoidea a los puntos de datos. Los valores de K_D para mAb se determinaron por el método de Akera y Cheng (1977, *Biochim Biophys Acta* 470: 412-423).

Resultados

Para estos estudios, los espaciadores de hapteno se alargaron progresivamente de 4-10 átomos para aumentar el potencial de mayor interacción de las estructuras similares a la de MET con el sitio de unión al anticuerpo y para aumentar la flexibilidad del espaciador. Se planteó la hipótesis de que un alargamiento progresivo de la rama separadora podría conducir a aumentos en la afinidad debido a un mejor acceso a toda la estructura similar a la de MET; y las diferentes conformaciones inmovilizadas podrían producir anticuerpos que tuvieran diferente selectividad conformacional para compuestos similares a (+)MET.

Los haptenos se conjugaron con los grupos amino terminales de lisinas en albúmina de suero bovino u ovoalbúmina mediante química de carbodiimida, que forma un enlace peptídico con el ácido carboxílico disponible en el hapteno. Había 59 lisinas en la albúmina de suero bovino, 20 en cada una de las cuatro subunidades de ovoalbúmina e incluso están disponibles más sitios de conjugación en la albúmina de suero bovino cationizada (es decir, Modulador Inmune Inject Supercarrier). Sin embargo, no todas las lisinas o sitios de conjugación estaban disponibles en la superficie de la proteína para acoplarse a los haptenos. Los experimentos preliminares de optimización mostraban que una proporción de hapteno con respecto a proteína de 30:1 a 90:1 proporcionaron las mejores tasas de incorporación para las síntesis. Aunque la tasa de incorporación de haptenos para los antígenos no se pudo determinar con precisión, los estudios de espectrofotometría de masas inicial indicaban que con cada molécula de proteína se conjugaba un promedio de 4 haptenos.

Dado que el objetivo principal era seleccionar mAb de alta afinidad, la dosis de antígeno se mantuvo relativamente baja (por ejemplo, 10-20 μg). Aunque la inmunización con dosis más altas de hapteno-antígeno (por ejemplo, 50-100 μg) en ocasiones conducía a títulos más altos, la afinidad para (+)MET a menudo era demasiado baja. Por lo tanto por lo general se usaba una dosis mínima de antígeno. Esta estrategia de forma rutinaria llevó a una respuesta inmunológica solamente en un 40-70 % de los animales. En estudios más recientes, se descubrió que una razón principal para una respuesta inmunológica < 100 % era la baja tasa de incorporación del hapteno en los antígenos de proteína, que en parte era superada por el uso con criterio de los adyuvantes completos e incompletos de Freund para reforzar y mantener la respuesta inmunológica .

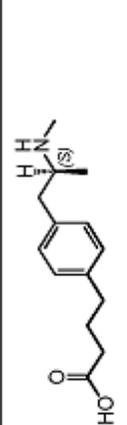
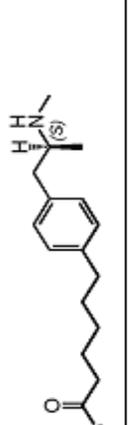
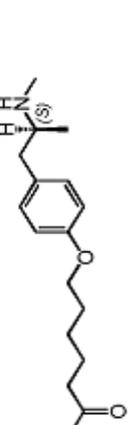
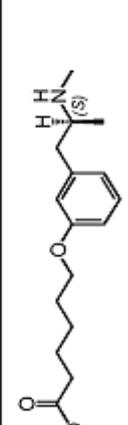
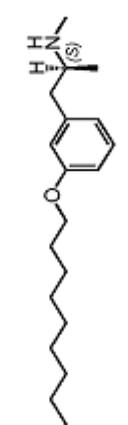
Cada suero de ratón de cada grupo de inmunizaciones se identificó sistemáticamente de manera rutinaria (por lo general 6-10 ratones) después de cada refuerzo para determinar la madurez de la respuesta inmunológica y las

- características inmunoquímicas relativas del suero policlonal (título, afinidad y especificidad). Para ello, se usó un RIA de [³H]-(+)-MET. El ensayo de identificación sistemática siempre implicaba inhibiciones de la unión de [³H](+)-MET con dosis crecientes de (+)-MET y (+)-AMP para determinar las afinidades relativas para cada ligando. La elección final de un ratón específico para su uso en la generación de hibridomas se basó principalmente en el animal con el título más alto y la afinidad hacia (+)-MET. A partir de este proceso de identificación sistemática de suero inmunológico, por lo general se encontraron de 3 a 10 anticuerpos monoclonales únicos de cada fusión. Lo más importante, un antisuero policlonal que era positivo para (+)-AMP no se descubrió hasta que se usó el hapteno MO10.
- 10 Para producir los hibridomas, se eligieron ratones que se habían inmunizado con Adyuvante completo de Freund y que se habían estimulado con Adyuvante incompleto de Freund. La única excepción fue las inmunizaciones con (+)-MET P6, que usaron Titermax como el adyuvante. En experimentos de optimización preliminares, se sometieron a ensayo inmunizaciones con antígenos precipitados de alum, adyuvante de Titermax y adyuvante de Ribí en varias ocasiones. Aunque estos adyuvantes por lo general producían títulos elevados, se encontró que los anticuerpos de mayor afinidad se generaban con adyuvantes de Freund.

Ejemplo 2. Estudios de Reactividad Cruzada de MAb

- Después de identificar sistemáticamente aproximadamente 25.000 líneas de células potenciales de hibridoma para la producción de mAb, se estudiaron ampliamente cinco mAb con las características inmunoquímicas más favorables para las propiedades moleculares y la eficacia preclínica (véase la Tabla 1). El resto de las líneas celulares de hibridoma se almacenaron congeladas en caso de necesidad futura. La selección de un mAb para ensayos *in vitro* e *in vivo* más amplios se basó en el deseo de tener una gama de afinidades, una gama de especificidades de fármaco y un alto nivel de producción de mAb a partir de la línea celular de hibridoma precursora. Este criterio final era necesario para aumentar la viabilidad de la producción de mAb a gran escala para los ensayos *in vivo*. En la mayoría de los casos había uno o más mAb de afinidad o especificidad similares que se producían a partir de la misma fusión. Por ejemplo, las fusiones separadas que producían mAb6H4 y mAb4G9 (véase la Tabla 1) también producían mAb virtualmente con la misma afinidad y especificidad, pero con secuencias de aminoácidos ligeramente diferentes. Estos dos anticuerpos en particular se eligieron debido a que la línea celular de hibridoma precursora producía más mAb de forma significativa.

Tabla 1. Estructura Química de Haptenos, el mAb Resultante, y Valores de K_D para Fármacos Fundamentales

Estructura del Hapteno	Nombre del Hapteno	Nombre del mAb (Isotipo y cadena ligera)	Psicoestimulantes Fundamentales		
			K_D de (+)MET (nM)	K_D de (+)AMP (nM)	K_D de (+)MDMA (nM)
	(+)MET P4	mAb6H8 (IgG ₁ κ)	250	41.000	106
	(+)MET P6	mAb6H4 (IgG ₁ κ)	11	4000	4
	(+)MET P06	mAb6H7 (IgG _{2b} κ)	95	47.000	87
	(+)MET M06	mAb9B11 (IgG ₁ λ)	41	5000	123
	(+)MET M010	mAb4C9 (IgG _{2b} κ)	34	120 (51 nM con [H] -(+)AMP)	140

Resultados

Se usó RIA para determinar la afinidad relativa y el perfil de reactividad cruzada de cada mAb (Tablas 1 y 2). Solamente uno de cinco haptenos generó los mAb con el potencial terapéutico deseado. La inmunización con el hapteno MO10 dio como resultado la producción de mAb (mAb4G9) con unión de afinidad elevada con respecto a (+)MET, (+)AMP, y que (+)MDMA; poca o ninguna reactividad cruzada con isómeros similares a (-)MET; y ninguna reactividad cruzada significativa con compuestos endógenos o medicamentos comunes estructuralmente similares (Tablas 1 y 2). Ninguna otra posición de hapteno/conector proporciona un anticuerpo con afinidad elevada para estos tres fármacos de adicción.

10

Tabla 2. Caracterización de las especificidades de unión de tres prototipos importantes de mAb anti-MET/MDMA o anti-MET/MDMA/AMP

Fármaco	Especificidad del Anticuerpo (Potencia Relativa con respecto a MET) ^a		
	mAb6H4 (11 nM) ^b	mAb6H8 (250 nM) ^b	mAb4G9 (34 nM) ^b
(+)MET	1,00	1,00	1,00
(+)AMP	0,001	0,023	0,34
(+)MDMA	1,25	3,40	0,29
(-)MET	0,030	0,011	0,102
(-)AMP	< 0,001	0,003	0,063
(-)MDMA	0,007	0,018	0,011
(+)MDA	0,001	0,024	0,090
(-)MDA	< 0,001	< 0,001	0,002
4-OH-MET	0,588	0,294	0,106
(+)pseudoefedrina	< 0,001	0,018	0,004
(+)norpseudoefedrina	< 0,001	< 0,001	< 0,001
/-fenilefrina	0,001	< 0,001	< 0,001
(+)efedrina	< 0,001	< 0,001	< 0,001
(+)fenilpropanolamina	< 0,001	< 0,001	< 0,001
β-feniletilamina	< 0,001	< 0,001	0,001
tiramina	< 0,001	< 0,001	< 0,001
dopamina	< 0,001	< 0,001	< 0,001
norepinefrina	< 0,001	< 0,001	< 0,001
serotonina	< 0,001	< 0,001	< 0,001
epinefrina	< 0,001	< 0,001	< 0,001

^a Potencia relativa con respecto a MET = (valor de CI50 con RIA para MET/RIA, valor de CI50 para el ligando de ensayo). Véase la Tabla 1 para las estructuras de los haptenos usados para generar estos anticuerpos.

^b Valor de CI50 para unión a MET a partir de la Tabla 1.

Dado que mAb4G9 era el único mAb en presentar reacción cruzada de forma significativa con (+)AMP (Tablas 1 y 2), afinidad hacia (+)AMP se examinó con más detalle. Para esto, se realizó un análisis de RIA usando [³H]-(+AMP (además de un RIA con [³H]-(+MET) y AMP como el inhibidor. Estos datos mostraban que la afinidad real hacia AMP era 51 nM (Tabla 1), lo que demuestra que este mAb tiene prácticamente el mismo valor de K_D para AMP y MET. [³H]-(+MDMA no estaba disponible para determinar un valor más preciso de K_D para la unión de (+)MDMA, pero parece probable que el valor real de K_D podría ser significativamente menor que el valor indicado por la inhibición de MDMA de la unión de [³H]-(+MET) en el RIA.

La unión del conector del hapteno distal al centro quiral de la molécula proporcionó una especificidad refinada hacia los isómeros (+) (Tabla 2). La longitud relativamente corta de las ramas espaciadoras de los haptenos (+)MET P4 y (+)MET P6 (conectores de 4 y 6 carbonos, respectivamente), acoplados con uniones en el carbono en la posición

- para el anillo de fenilo de (+)MET (Tabla 1), dificultaba la flexibilidad de los haptenos. Esto probablemente forzaba a que el sistema inmunológico reconociera la presencia del grupo metilo en la molécula de nitrógeno de (+)MET y (+)MDMA y su ausencia en (+)AMP. Por lo tanto, la afinidad de mAb era elevada para (+)MET y (+)MDMA, pero baja para (+)AMP. El hapteno (+)MET PO6, similar a (+)MET P6, se diseñó con un conector unido al carbono para el anillo de fenilo, pero se incluyó un oxígeno para influir en la carga localizada y la solubilidad para imitar la presencia de uno de los átomos de oxígeno en las posiciones para y meta del grupo metilendioxi de (+)MDMA (Tabla 1). Un oxígeno unido a la estructura del anillo de fenilo estaba incluido en otros dos haptenos, (+)MET MO6 y (+)MET MO10, pero los conectores estaban unidos en el carbono en la posición meta del anillo de fenilo de (+)MET. Esta estrategia se diseñó para presentar una estructura similar a la de (+)MDMA a lo largo del mismo plano espacial que el centro quiral de la molécula de (+)MET. El espaciador (+)MET MO10 más largo se usó para permitir más flexibilidad en el hapteno en la proteína con esperanzas de descubrir los mAb(s) con un reconocimiento más amplio de estructuras similares a la de (+)MET. Estas estrategias combinadas dieron como resultado el mejor balance de afinidad y especificidad.
- 15 A partir de estos estudios, se aprendió que 1) los conectores situados de manera distal con respecto al centro quiral de esta molécula muy pequeña favorecen la generación de anticuerpos estereoespecíficos, 2) una rama de conector flexible más larga similar a la de (+)MET MO10 favorece la generación de anticuerpos con una selectividad más amplia con respecto a compuestos similares a (+)MET, y 3) los espaciadores con ≥ 6 átomos producen mAb con una afinidad más elevada. De manera importante, el descubrimiento de mAb4G9 no era un suceso aislado, ya que desde entonces se han descubierto otros mAb obtenidos a partir de MO10 con especificidades similares a la de (+)MET y (+)AMP.

Ejemplo 3. Análisis de Secuencia de Anticuerpo

- 25 Para conseguir una mejor comprensión molecular de cómo la secuencia de aminoácidos principal influía en la afinidad del mAb con respecto a (+)MET, se analizaron características de secuencias relacionadas y no relacionadas en cada región variable del mAb. Tres de los mAb eran de la subclase de IgG1 y dos eran IgG2 (Tabla 1). Excepto para el mAb9B11 anti-MET/MDMA (cadena ligera λ), todos los mAb poseían una cadena ligera κ .

30 Clonación de ADNc y secuenciación de mAb

- Para estos estudios, se analizaron cinco prototipos de mAb anti-MET cuyas afinidades hacia MET variaban de 11 a 250 nM (Tabla 1). Para estudios detallados se eligió un solo prototipo de mAb resultante de cada uno de los haptenos. El ADNc de la cadena ligera (LC, singular y plural) del mAb se clonó mediante RT-PCR usando transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) con un extremo C-terminal de emparejamiento con cebador impreso exacto de la cadena ligera denominado MLEND1.Not (5'-GGG GCG GCC GCG CGT CTC AGG ACC TTT GTC TCT AAC-3') (SEQ ID NO: 1). Las cadenas ligeras de mAb6H4, mAb6H8, y mAb6H7 se amplificaron en la dirección directa con el cebador ML2 degenerado, y la cadena ligera de mAb4G9 se amplificó en la dirección en la posición 5' con el cebador ML4 degenerado (Coloma *et al.*, 1992). La cadena ligera de mAb9B11 se amplificó en la dirección directa con la secuencia del cebador 5'-ATGGCCTGGA(T/C)TTCACCTTACTCTCTCTCTCTGGCTCTC-3' (SEQ ID NO: 2). El ADNc resultante se ligó de manera directa en el sitio *Sma* I del vector de clonación pGEM-3Z.

- El ADNc de la cadena pesada de todos los mAb de IgG1 (de (+)MET P4, (+)MET P6 y (+)MET MO6) se amplificó usando RT-PCR como se ha descrito anteriormente con un cebador inverso exacto con respecto al extremo C-terminal de la cadena pesada, denominado MHEND.Not1 5' GGG GCG GCC GCA GGG CTC CAA GGA CAC TGG GAT CAT TT 3' (SEQ ID NO: 3), y una mezcla de tres cebadores degenerados en los cebadores MHALT de Coloma *et al.*, (1992, J Immunol Methods 152: 89-104). Los cebadores se modificaron a partir de la secuencia publicada originalmente solamente mediante la sustitución de un sitio de restricción Nhe I para el sitio de restricción original. El mAb de IgG2 (de (+)MET PO6 y (+)MET MO10) se amplificó con el cebador inverso 5-CTCCCGGTCTCCGGGTAAATGA-3' (SEQ ID NO: 4).

- La secuencia directa de la cadena pesada de mAb6H8 se amplificó con el cebador MHALT1 (Coloma *et al.*, 1992, J Immunol Methods 152: 89-104). Los cebadores directos para mAb6H4, mAb6H7, mAb9B11, y mAb4G9 se diseñaron a partir de los resultados de la secuenciación N-terminal de las proteínas maduras (véanse las Fig. 1A y B para secuencias de proteína). Las secuencias del cebador usadas fueron: 5'-GAGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTAGC-3' (SEQ ID NO: 5) para mAb6H4, 5'-GATGTAAAACCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAACCTTCTCAGTC-3' (SEQ ID NO: 6) para mAb6H7, 5'-GAG-GTGCAGCTTCCGGAGTCAGGACCTAGC-3' (SEQ ID NO: 7) para mAb9B11, y 5'-GAGTACCAGCTCCAGCAGTCT-GGGAC-3' (SEQ ID NO: 8) para mAb4G9. A continuación el ADNc se ligó directamente en el sitio *Sma* I del vector de clonación pGEM-3Z. Los plásmidos resultantes de toda la clonación de mAb se transformó en la cepa DH5 α de *E. coli* y se secuenció en University of Arkansas for Medical Sciences ADN Core Sequencing Facility.

- Todas las secuencias se presentaron en la base de datos de GenBank. Los números de registro asignados por GenBank para las cadenas ligeras de mAb6H8, mAb6H4, mAb6H7, mAb9B11, y mAb4G9 son 774083, 786626, 877567, 881246, y 877579 respectivamente. Los números de registro asignados por GenBank para las cadenas

pesadas de mAb6H8, mAb6H4, mAb6H7, mAb9B11, y mAb4G9 son 774081, 774071, 881226, 877571, y 877573, respectivamente. El uso de la línea germinal de los diferentes mAb se determinó por comparación de las secuencias de ADN con las de la base de datos de IMGT usando las herramientas del programa V-QUEST basado en la web (dirección de Internet: <http://imgt.cines.fr>) y mediante examen visual de las secuencias (Giudicelli *et al.*, 2004, Nuc Acid Res 32: W435-440).

Resultados

Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la región variable del mAb se presentan en la Fig. 1. Un análisis de las regiones determinantes de la complementariedad reveló un alto grado de diversidad tanto en la composición como en la longitud. La longitud de las primeras CDR de cadena ligera (L1) variaba en 10-14 restos, y con la excepción de mAb4G9, poseía un gran número de restos de serina (Fig. 1B). El único resto conservado en la L1 de CDR, o cualquiera de las CDR de cadena ligera, era la serina en la posición L26. Las CDR de la L2 tenían una longitud de 7 restos excepto para mAb6H7, que solamente poseía 5 aminoácidos. Todas las CDR de la L3 tenían una longitud de 9 restos excepto mAb4G9 que tenía 10 restos. Las CDR de las regiones de cadena pesada (Fig. 1A) presentaban H1 y H2 de las CDR de longitudes similares, pero poca homología. La H1 de CDR presentaba una treonina conservada en la posición H30 y cualquiera de un triptófano o tirosina en la posición H33. La H3 de CDR se diferencia en la longitud de 8-16 restos. Aunque no era inmediatamente evidente a partir del alineamiento, todas las regiones H3 o serían dos restos de tirosina separados por cinco restos, con la segunda tirosina antes del triptófano en H103.

Aunque las comparaciones de secuencias de CDR son importantes, las diferencias en la CDR se pueden atribuir a diferencias en las secuencias de la línea germinal de genes de la región V en particular, y a la mutación somática dentro de las CDR de estos genes de la región V. para entender mejor la importancia relativa de las mutaciones de la línea germinal y somática, los genes secuenciados se analizaron usando la base de datos de IMGT (Giudicelli *et al.*, 2004, Nuc Acid Res 32: W435-440). El análisis mostraba que cada anticuerpo era único y no clonal. Es decir, en lugar de proceder de una colocación del gen de la línea germinal inicial en el desarrollo de linfocitos B, estos resultaban de sucesos de recombinación de V(D)J únicos. Estas colocaciones de genes de la línea germinal únicas a continuación se sometieron a mutaciones de ADN somáticas, que a menudo eran silenciosas, pero algunas daban como resultado cambios de aminoácidos que se diferenciaban con respecto al gen de la línea germinal original. Por lo tanto, no se encontró un patrón de respuesta claro.

Este análisis de secuencias esclarecía diferencias de secuencias únicas en las CDR del anticuerpo. Una característica común era una prolina conservada en la posición 95 o 95a de todas las regiones L3 de CDR, excepto para mAb9B11 (Fig. 1 B), que tenía un resto de serina. Debido su capacidad para formar "bisagras", los restos de prolina a menudo proporcionan flexibilidad en la secuencias de proteínas de la cadena principal. Esta prolina/serina IVA inmediatamente seguida de cualquiera de un aminoácido hidrófobo (es decir leucina o valina al igual que en mAb6H4 y mAb9B11, respectivamente) o un resto aromático. Es posible que estos restos pudieran ser importantes para la interacción con el anillo de fenilo de compuestos similares a (+)MET a través de interacciones hidrófobas o pi-pi, y la prolina precedente podría proporcionar flexibilidad para adaptarse a diferentes conformaciones.

Ejemplo 4. Modelado y Replicación Molecular

Basándose en los resultados del alineamiento de la secuencia primaria, se eligieron tres mAb (mAb6H4, mAb6H8 y mAb4G9) para modelado estructural. A cada región variable de CDR se le asignó y se le dio una clasificación canónica (Al-Lazikani *et al.*, 1997, J Mol Biol 273: 927-948), excepto para las CDR de H3, que no poseían clases canónicas.

Modelado y análisis estructural de región variable de IgG

El modelado molecular de la estructura tridimensional de las regiones variables de tres de los mAb se realizó usando el algoritmo de modelado de anticuerpos WAM (Whitelegg y Rees, 2000, Protein Eng 13: 819-824). mAb6H4, mAb6H8, y mAb4G9 se eligieron para un análisis más detallado debido a que presentaban la gama completa de afinidades para (+)MET y una amplia gama de especificidades de ligandos para otros fármacos importantes similares a MET. Las secuencias de aminoácidos primarios de las regiones variables de HC y LC se sometieron primero al sitio de modelado de anticuerpo de WAM para alineamiento. El programa alineó las secuencias frente a secuencias conocidas en la base de datos y buscó clases canónicas de regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Basándose en estas clasificaciones, el programa asignó una estructura tridimensional a las regiones marcó conservada y de CDR ajustando la cadena principal a la de las estructuras conocidas más cercanas.

Replicación Molecular

Para la simulación de acoplamiento, se usó el programa FlexX (Tripos). En primer lugar, se identificó un bolsillo profundo en la superficie de contacto de las regiones CDR a partir del modelado superficial y cálculos electrostáticos en Pymol (Delano Scientific, San Carlos, CA) y Sybyl (Tripos). Para definir esta región como un supuesto sitio activo,

se seleccionaron restos dentro de un área de 6 Å alrededor de F L94 (para mAb6H4) o Y L94 (para mAb4G9). Al ligando de MET se le asignaron cargas formales mediante Sybyl y se permitió una flexibilidad parcial a la molécula. El programa se ajustó para encontrar las 30 mejores conformaciones de replicación y se devolvieron en una tabla de puntuación de consenso.

5

Resultados

Los modelos tridimensionales presentaban una conformación clásica de plegamiento en lámina β del anticuerpo (FIG. 2). En general, todos los modelos presentaban conformidad con las limitaciones geométricas a través de las estructuras. El análisis indicaba que menos de un 2 % de los restos tenían ángulos Ψ y Φ de la cadena principal en regiones alejadas. Parecía que los tres modelos se conformaban de manera razonablemente buena con respecto a las características y limitaciones estructurales conocidas de las proteínas, y presentaban una base apropiada para realizar el análisis de replicación de base.

15 Todas las CDR entraban dentro de las clases canónicas excepto L3 de mAb4G9 y las CDR de H3, que no tienen clases canónicas. Las regiones H3 de CDR de los tres anticuerpos se predijeron para formar una conformación acodada u "horquillada", en lugar de conformación extendida. La comparación de los modelos reveló elementos estructurales conservados y algunas diferencias potencialmente importantes en las desviaciones de la raíz cuadrada media (RMSD) de las configuraciones en bucle de CDR (Fig. 3). La estructura de bucle de mAb6H4 se eligió de manera arbitraria como punto de referencia para comparar las diferencias de los otros dos anticuerpos, ya que tenía la afinidad más alta para (+)MET. Las L2 de CDR de los tres anticuerpos ocupaban casi las mismas posiciones espaciales. Las regiones L3 de mAb6H4 y mAb6H8 eran muy similares, a pesar de que se diferenciaban en la afinidad hacia (+)MET en aproximadamente 25 veces.

25 Basándose en los resultados del modelado, la simulación de replicación se realizó con mAb6H4 y mAb4G9. De acuerdo con los modelos (Fig. 3), se formó un bolsillo profundo por la interacción de los bucles H1, H2, L1 y L3 de CDR para ambos anticuerpos, con un bolsillo más ancho formado en la región de unión de mAb4G9 debido a una CDR de H3 más corta. En estos bolsillos de mAb se creó una replicación teórica de (+)MET y se identificaron restos de 8 angstroms del ligando como posibles sitios para la interacción de ligando-mAb (Fig. 3). Los resultados de esta replicación basada en FlexX indicaban que la molécula de MET estaba orientada por lo general con el grupo fenilo hidrófobo hacia el interior del bolsillo. En mAb6H4 y mAb4G9, el nitrógeno cargado de MET estaba en estrecha proximidad con una histidina en la posición L32 y H35 respectivamente.

Basándose en los análisis de modelado molecular, la superficie de contacto entre (+)MET y el mAb era relativamente pequeña, (el área superficial de (+)MET es 174 \AA^2) con pequeños desplazamientos en la conformación de la proteína que producen grandes cambios en la unión. Como se puede observar en la Fig. 2, las desviaciones más sorprendentes aparecen en la región CDR de H3, con una RMSD de aproximadamente 6 Å y que 7 Å en mAb6H8 y mAb4G9, respectivamente. La diversidad en las posiciones de la CDR sugiere que cada uno de estos anticuerpos presentaba un paradigma de unión con respecto a fármacos similares a (+)MET que en cierto modo era independiente de la configuración del bucle. La representación superficial de los modelos exponía un bolsillo profundo en la superficie de contacto de CDR de mAb6H4. Parecía que este bolsillo tenía aproximadamente el tamaño de (+)MET y probablemente podría acomodar la replicación del ligando. Por el contrario, el bolsillo de unión potencial de mAb4G9 era más ancho y menos profundo. Se plantea la hipótesis de que la rama conectora más larga de (+)MET MO10 combinada con el ángulo diédrico cambiado de un oxígeno en la posición meta del anillo de fenilo contribuía a la formación de un bolsillo más grande. El análisis indicaba que solamente cinco de los seis bucles de CDR, podrían estar directamente implicados en la unión de fármacos similares a (+)MET, con L2 presentando poco contacto. La simulación de replicación de (+)MET con FlexX indicaba que los bolsillos de unión potenciales estaban dominados por restos aromáticos con algunos capaces de realizar enlaces de hidrógeno (es decir, histidina y tirosina).

50

Ejemplo 5. Mercapto-haptenos

El grupo de unión en un hapteno se modificó para determinar si el número de uniones por vehículo se podría aumentar. Se encontró que un hapteno que contenía un grupo sulfhidrilo en lugar de un grupo ácido carboxílico presentaba un aumento del acoplamiento covalente con respecto a una proteína vehículo activada maleimida. La eficacia del acoplamiento también era altamente reproducible y requería bajas proporciones de partida de hapteno con respecto a proteína. Esta estrategia de acoplamiento ofrece ventajas significativas con respecto al acoplamiento de carbodiimida a la vez que se mantienen que otras características críticas del hapteno (+)MET-MO10. Por lo tanto, este nuevo hapteno (denominado (+)MET-SH-MO10 para el grupo sulfhidrilo en el extremo de la rama espaciadora) ofreció una mejora significativa con respecto al acoplamiento de carbodiimida, que a menudo era ineficaz con poca reproducibilidad de la reacción química. Como se ha descrito anteriormente, el acoplamiento de carbodiimida por lo general daba como resultado solo aproximadamente cinco haptenos similares a (+)MET por molécula de albúmina. Esta proporción era inferior a la ideal porque se iniciaba una respuesta de escasa a no inmunológica cuando se incorporaban muy pocos haptenos (≤ 4) en la molécula vehículo, pinzas que la calidad y la cantidad de la respuesta inmunológica aumentaba en gran medida con densidades de epítipo de hapteno mayores (es decir, 8-12 haptenos

65

por molécula de albúmina (Owens, *et al.*, 1988, J Pharmacol Exp Ther 246: 472-478).

Aunque la relación entre la tasa de incorporación y la respuesta inmunológica no se conoce para antígenos similares a (+)MET, es un factor crítico en la optimización de la respuesta inmunológica. La consecución de tasas de incorporación reproducibles, elevadas con haptenos de ácido carboxílico siempre ha sido un desafío, al igual que lo ha sido, hasta hace poco, la medición precisa de tasas de incorporación de hapteno. El nuevo mercapto-hapteno ayudará a aliviar la estimulación de bajas tasas de incorporación.

Determinación de tasas de incorporación a partir de reacciones de conjugación

10 En experimentos para determinar la eficacia del acoplamiento de los nuevos mercapto-haptenos, se añadieron concentraciones molares crecientes del prototipo de hapteno (+)MET-SH-MO10 con respecto a una concentración molar fija de albúmina de suero bovino activada con maleimida adquirida en el mercado (Pierce Chemical). La síntesis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proporción molar de partida de hapteno con respecto a albúmina de suero bovino activada con maleimida era de 0:1 (sin hapteno añadido), 10:1, 15:1, 20:1 y 25:1. Después de completar la reacción con el análisis de MALDI TOF MS de las muestras mostraba que la proporción molar real de hapteno con respecto a proteína vehículo de albúmina de suero bovino era de aproximadamente 0:1 (sin hapteno añadido), 4:1, 8:1, 10:1 y 10:1, respectivamente. Esto indicaba que la reacción de síntesis era extremadamente eficaz con aproximadamente 1 mol de hapteno siendo incorporado para cada 2 moles de hapteno añadido a la reacción. Sin embargo, parecía que había un máximo de 10 sitios activados con maleimida disponibles en la albúmina de suero bovino (véase la Fig. 4A).

25 En experimentos previos con un carboxi-hapteno ((+) MET MO10) usando una proporción inicial de 30:1 de hapteno con respecto a albúmina de suero bovino y una reacción de carbodiimida, se obtuvo un máximo de 5:1 de haptenos por molécula de albúmina de suero bovino. Estos datos sugieren que los mercapto-haptenos se acoplan de manera más eficaz a sus proteínas vegetales, ofreciendo de ese modo una síntesis con un coste significativamente menor. Además se puede incorporar un número de haptenos mucho mayor a cada proteína (10:1 para el mercapto-hapteno con respecto a 5:1 para el carboxi-hapteno).

30 De forma análoga, el análisis de espectrometría de masas de los haptenos (+)MET-SH-MO10 con o sin ovoalbúmina activada con maleimida reveló que cuando 12 sitios de maleimida activados previamente estaban disponibles en la ovoalbúmina (panel superior, Figura 4B), se incorporaban 8 haptenos (+)MET-SH-MO10 por molécula de ovoalbúmina (panel inferior, Figura 4B). Se trataba de un aumento de un 60 % en la eficacia de acoplamiento en comparación con el acoplamiento de carbodiimida de MO10 a ovoalbúmina (5 MO10 haptenos por ovoalbúmina). Por lo tanto, los nuevos mercapto-haptenos (+)MET, similares a (+)MET-SH-MO10, podrían dar como resultado mayores densidades de epítomos sobre la proteína vehículo y aumentar de forma significativa los títulos y la probabilidad de generar antisuero policlonal de alta afinidad.

Inmunización, identificación sistemática y generación de hibridomas

40 Para todas las inmunizaciones se usaron ratones BALB/c hembra (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Para la producción del mAb (+)MET-SH-MO10, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea en los cuartos traseros con 20 µg del antígeno (+)MET-SH-MO10 emulsionado a 1:1 (v/v) en Adyuvante completo de Freund (FCA), (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). La inmunización inicial fue seguida de un refuerzo de 20 µg de antígeno emulsionado en Adyuvante completo de Freund tres semanas después seguido de dos refuerzos a intervalos de tres semanas, hasta que se alcanzaba un nivel de título favorable. Las muestras de suero se tomaron periódicamente a través de extracción de sangre de la cola para medir la IgG anti-(+)MET. Los títulos se midieron mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática) usando placas de microtitulación de 96 pocillos revestidas con el hapteno original conjugado con una proteína diferente. Por ejemplo, si el antígeno original era (+) MET-SH-MO10-Ovalbúmina (OVA), se usaba (+)MET-MO10 conjugado con tiroglobulina para evitar la selección de anticuerpos reactivos hacia proteína vehículo. La identificación sistemática de la respuesta de IgG anti-(+) MET se realizó mediante un radioinmunoensayo (RIA) de [³H]-(+)-MET, usando (+)MET, (+)MDMA y (+)AMP como los inhibidores. Después de conseguir los suficientes títulos de IgG anti-(+) MET, se utilizó tecnología de hibridoma convencional como se ha descrito anteriormente (Valentine *et al.*, 1994, J Pharmacol Exp Ther 269: 1079-1085). El compañero de fusión de hibridoma para linfocitos B de ratón fue la línea celular P3X63Ag8.653 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA). El isotipo de IgG y la identidad de la cadena ligera se determinaron con un kit de formación de isotipos de anticuerpos de ratón (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Los datos de reactividad cruzada de un mAb representativo se muestran en la Fig. 4C.

60 Ejemplo 6. Uso Simultáneo de (+)MET y Respuesta Inmune

La inmunización con el conjugado (+) MET P6-KLH se examinó con más detalle para determinar si la inmunización activa podría dar como resultado anticuerpos anti-(+)MET y si el uso crónico de (+)MET podría influir en la producción de anticuerpos anti-MET. Estas preguntas son importantes porque la generación de una respuesta de anticuerpos depende del reconocimiento específico del receptor inmunitario de conjugados de (+)MET, y el uso de

(+)MET por parte del paciente durante la inmunización podría bloquear una respuesta inmunológica.

Para estos estudios, se inmunizaron ratas Sprague-Dawley macho con KLH (grupo control) o con el conjugado (+)MET p6 hapteno-KLH (véase la Tabla 1 para la estructura del hapteno). Los animales con (+)MET P6-KLH se dividieron adicionalmente en dos grupos inmunizados - uno sin administración posterior de (+)MET, y el otro estimulado de forma repetida con (+)MET (3 mg/kg *ip*; dos veces a la semana). El análisis de las afinidades relativas de anticuerpos se consiguió en un ELISA mediante la adición de concentraciones crecientes de (+)MET al suero inmunológico de ratón en los pocillos de placa de microtitulación revestidos con un conjugado de (+)MET P6-ovoalbúmina.

10 Con esta medida, ambos grupos de ratas inmunizadas con (+)MET P6-KLH desarrollaron y mantuvieron títulos de anticuerpos anti-(+)MET a lo largo del periodo de inmunización de 53 días (Fig. 5, círculos abiertos y cerrados) en comparación con las ratas inmunizadas con KLH de control, que no presentaban respuesta (cuadrados). La administración repetida de (+)MET a los animales inmunizados no influía en el desarrollo o mantenimiento de los
15 títulos de anti-(+)MET (círculos abiertos), en comparación con las ratas inmunizadas sin una estimulación con (+)MET. Para determinar si se producía un cambio relativo en la afinidad de anticuerpos séricos para (+)MET en ratas que recibían una administración repetida de (+)MET, no había diferencia entre la afinidad relativa del anticuerpo para (+)MET entre grupos sin estimular y estimulados con (+)MET (Fig. 6).

20 Por lo tanto, la estimulación de las ratas mediante la administración repetida de (+)MET durante el estudio no influía en las constantes de afinidad del anticuerpo para los títulos de (+)MET o de suero de anticuerpo. Estos estudios demuestran que el uso crónico de (+)MET no interfiere con la cantidad (título) o calidad (especificidad, afinidad) de la respuesta de anticuerpos anti-(+)MET. Estos son hallazgos importantes porque muchos pacientes adictos probablemente usarán (+)MET durante sus tratamientos de inmunización activa.

25

Ejemplo 7. El mAb anti-(+)MET Altera la Farmacocinética de (+)MET en Ratas

La capacidad del mAb anti-(+)MET6H4 (generado contra el hapteno (+)MET P6, véase la Tabla 1) para alterar las concentraciones de (+)MET en el cerebro se examinó en dos modelos diferentes de abuso de (+)MET (Byrnes-Blake
30 *et al.*, 2005, Eur J Pharmacol 521: 86-94).

El modelo de sobredosis se diseñó para imitar a un drogadicto que tomaba una alta dosis *iv* de (+)MET y se trató con mAb de (+)MET en la sala de emergencias. En este modelo, las ratas recibían 1 mg/kg de (+)MET (*iv*) seguido
35 30 min después por una dosis de mAb anti-(+)MET. El modelo de tratamiento previo con mAb se diseñó para imitar el tratamiento farmacológico de un drogadicto al que se le administra una medicación de mAb anti-(+)MET al inicio de la terapia de modificación del comportamiento que recae en el uso (+)MET. En este modelo, las ratas fueron se trataron previamente con mAb anti-(+) MET6H4 y recibían una dosis de 1 mg/kg *iv* de (+)MET al día siguiente. Esta dosis (sin mAb) producía aproximadamente 2,5 horas de efectos locomotores. Las ratas (3/punto de tiempo) se sacrificaron en tiempos variables después de la administración de (+)MET para determinar las concentraciones de
40 (+)MET en el cerebro. Como se muestra en la Fig. 7, mAb6H4 disminuirá las concentraciones de (+)MET en el cerebro en ambos modelos. De hecho, las concentraciones de (+)MET en el cerebro en ambos modelos eran prácticamente superponibles en momentos comparables después de 30 minutos - el tiempo de administración de mAb en el modelo de sobredosis. Ambos estudios demuestran claramente que los anticuerpos contra (+)MET pueden reducir de forma significativa las concentraciones de (+)MET en el cerebro con el tiempo.

45

A continuación se determinó la semivida "funcional" de cada uno de los mAb anti-(+)MET mencionados anteriormente (véase la Tabla 1). Este ensayo "funcional" comparaba las concentraciones de (+)MET en ausencia y presencia de dos mAb. Con esta medida, los mejores anticuerpos son los que tienen los aumentos más elevados y más largos en las concentraciones séricas de (+)MET y (+) MP. En primer lugar, se determinó que las propiedades farmacocinéticas de los mAb no eran diferentes. Por ejemplo, todos presentaban una semivida en suero de aproximadamente 7-8 días, lo que descartaba la posibilidad de que uno o más de ellos se eliminaran rápidamente y por lo tanto se inactivaran a través de la eliminación. También se demostraba el potencial para producir una terapia anti-(+)MET de acción prolongada mediante inmunización pasiva o activa.

55 Para realizar los estudios "funcionales", se les administraron infusiones continuas de (+)MET de 14 días a 5,6 mg/kg/día mediante minibombas osmóticas *sc*. Después de alcanzar las concentraciones de (+)MET en estado estacionario (a las 24 h), cada rata se trató con una dosis de mAb que era equimolar en los sitios de unión con respecto a la carga corporal en estado estacionario de (+)MET. Solo se administró una dosis única de mAb en este momento, pero se administró una infusión continua de (+)MET a una tasa de un 50 % de la carga corporal por hora
60 para mantener un estado estacionario (+)MET. Las muestras de suero se recogieron antes del mAb y en los momentos después de la administración del mAb. Todos los mAb anti-(+)MET causaban aumentos agudos significativos en las concentraciones de (+)MET en suero en comparación con los controles pre-mAb. Sin embargo, se producían diferencias sustanciales en la concentración de (+)MET en suero con respecto a las curvas de tiempo para los cinco mAb (Fig. 8, símbolos abiertos). Parecía que la mayoría de los mAb anti-(+)MET estaban parcialmente
65 inactivados en diferentes grados con el tiempo, tal como se consideró por su incapacidad para mantener altas

concentraciones de (+)MET en suero con el tiempo. Esta inactivación fue particularmente sorprendente para el mAb6H4 de mayor afinidad ($K_D = 11$ nM). Sin embargo, mAb4G9 ((+)MET y (+)AMP, $K_D = 34$ y 51 nM, respectivamente) también era muy eficaz después de aproximadamente 2 semanas. También era el único mAb que mantenía concentraciones significativamente incrementadas de (+)AMP (círculos cerrados) y (+)MET (círculos abiertos) en el tiempo en comparación con las concentraciones pre-mAb (símbolos cuadrados con "A" y "M" en el interior).

Inicialmente se planteó la hipótesis de que la afinidad de mAb era la principal fuerza impulsora para la eficacia terapéutica. Sin embargo, estos estudios revelaban que la duración de la acción y la función del mAb anti-(+)MET *in vivo* se reducía basándose en las predicciones de la farmacocinética de mAb conocida, que era imprevista. La primera generación de haptenos (por ejemplo, (+)MET P6 y (+)MET P4) se diseñaron a propósito para producir los mAb específicos para (+)MET, con prácticamente ninguna reactividad cruzada con (+)AMP. Cuando se produjo la segunda generación de haptenos (por ejemplo, (+)MET MO10) con especificidad para (+)MET y (+)AMP, se descubrió que el mAb resultante (mAb4G9) tenía las otras ventajas de un aumento de la duración de la acción y la eficacia.

Listado de secuencias

<110> Junta Directiva de la Universidad de Arkansas OWENS, S. Michael GUNNELL, Melinda CARROLL, F. Ivy

<120> COMPUESTOS DE HAPTENO Y COMPOSICIONES Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 52592-122213

<150> US 60/913. 124

<151> 20-04-2007

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

ggggcggccg cgcgtctcag gacctttgct tctaac 36

<210> 2

<211> 39

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> N = T o C

<400> 2

atggcctgga nttcacttat actctctctc ctggctctc 39

<210> 3

<211> 38

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 3

ggggcggccg cagggctcca aggacactgg gatcattt 38

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

ES 2 619 647 T3

<400> 4
ctcccgtct ccgggtaaat ga 22

5 <210> 5
<211> 29
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10 <400> 5
gagtgcagct tcaggagtca ggacctagc 29

<210> 6
<211> 50
15 <212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 6
gatgtaaaac tcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc 50

20 <210> 7
<211> 30
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

25 <400> 7
gaggtgcagc ttccggagtc aggacctagc 30

<210> 8
30 <211> 26
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 8
35 gagtaccagc tccagcagtc tgggac 26

<210> 9
<211> 123
<212> PRT
40 <213> *Mus musculus*
<400> 9

ES 2 619 647 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Asp Ser Phe Gly Gly Ser Tyr Asp Gly Phe Tyr Ser Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115 120

- <210> 10
- <211> 117
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 10

ES 2 619 647 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Val Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Asp Tyr Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Lys Ser Val Ser Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser
 85 90 95

Tyr Phe Asp Ser Asp Asp Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser
 115

<210> 11
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 11

Asp Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Ser Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

10

ES 2 619 647 T3

Tyr Tyr Trp Asn Trp Asn Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asp Tyr Asp Glu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser
115

- <210> 12
- <211> 118
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 12

ES 2 619 647 T3

Glu Tyr Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Leu Tyr Gly Asn Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser

- <210> 14
- <211> 108
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 14

ES 2 619 647 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Arg Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ile Asn Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 100 105

- <210> 15
- <211> 110
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 15

ES 2 619 647 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Phe Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

<210> 16
 <211> 110
 <212> PRT
 < 213> *Mus musculus*

5

<400> 16

ES 2 619 647 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

- <210> 17
- <211> 111
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 17

ES 2 619 647 T3

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Ala Gly Ala Val Thr Ala Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Ile Arg Ala Pro Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Val Leu Trp Phe Ser Asn
 85 90 95

His Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Leu
 100 105 110

<210> 18
 <211> 110
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 18

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Phe
 20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

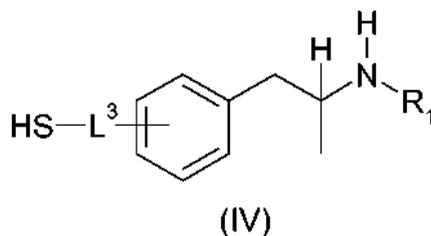
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Asn Leu Leu Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, compuesto que consiste en el isómero (+) de fórmula (IV):



5

en la que:

10 R_1 es hidrógeno o metilo; y
 L^3 es un conector de 10 átomos contiguos unidos al anillo de benceno en la posición meta, siendo los átomos seleccionados entre el grupo que consiste en un átomo de un hidrocarbilo, un átomo de un hidrocarbilo sustituido, y un heteroátomo.

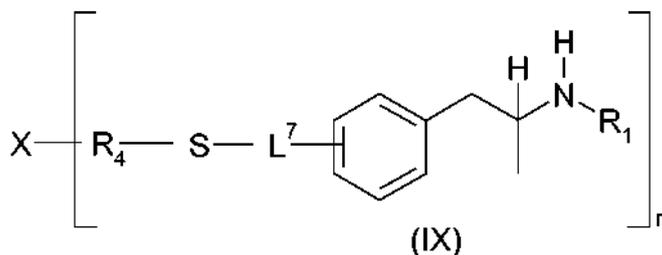
2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que L^3 es

15



3. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el compuesto está conjugado con una molécula vehículo, X, para formar un compuesto que tiene la fórmula (IX):

20



en la que:

25 R_1 es como se ha definido la reivindicación 1;
 n es un número entero mayor o igual que 3;
 X es una molécula vehículo que induce una respuesta inmunológica;
 R_4 se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace directo, hidrocarbilo, e hidrocarbilo sustituido;
 L^7 es L^3 como se ha definido la reivindicación 1.

30

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 en el que R_4 es [N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato.

5. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3 en el que L^3 es

35

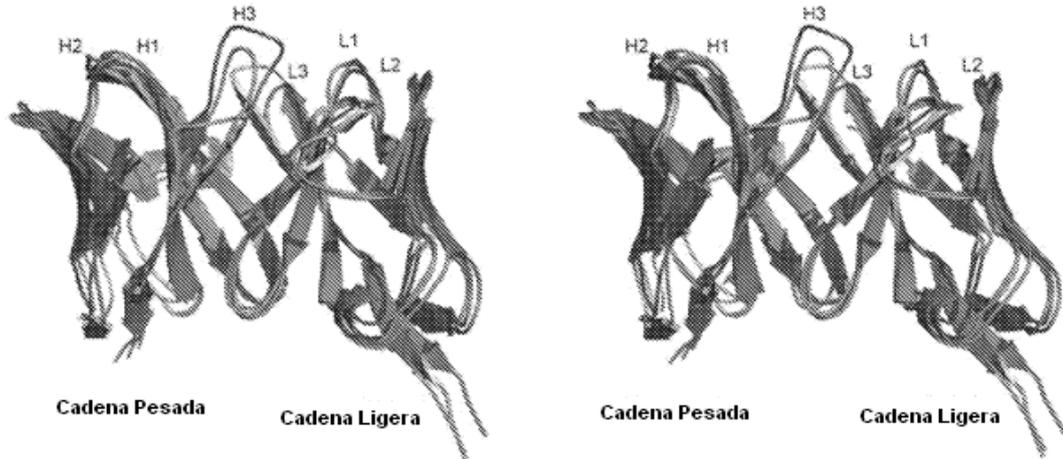


6. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en la generación de anticuerpos específicos para dicho compuesto en un sujeto.

Nombre del mAb	Kd (nM)	FR 1	CDR H1	FR 2
6H8	250	QVQLQQPGAE L V K P G A S M K L S C K A S G Y T F T S F W M H - W V K Q R P G Q G L E W I G E		
6H4	10	E V Q L Q E S G P S L V K P S Q T L S L T C S V T G D S V T S G Y W S - W I R Q F P G N K L D Y M G Y		
6H7	41	D V K L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T G S S I T S A Y Y W N W N R Q F P G N K L E W M G Y		
9B11	41	E V Q L P E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L T D G Y G V N W V R Q P P G K G L E W L G M		
4G9	40	E Y Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W M H - W V K Q R P G Q G L E W I G G		
		CDR H2	FR 3	
6H8	250	I N P S N G R N K Y N E K F K N K A T L T V D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C T R D S F		
6H4	10	I S - Y R G S T Y N P S L K S R I S I T R D T S K N Q V Y L Q L K S V S S E D T A T Y Y C S Y F D S		
6H7	41	I R Y D G Y N N - Y N P S L K N R I S I T R D T S K N Q F F L K L N S V T T E D T A T Y Y C A R D D Y		
9B11	41	I W - D D G D T D Y S S V L K S R L S I T K D N S K N Q V F L K M N R L Q T D D T A R Y F C A R D T L		
4G9	40	I Y P G N S D T T Y N Q K F K G K A K L T A V T S T S T A Y M E L S S L T N E D S A V Y Y C L Y G N Y		
		CDR H3	FR 4	
6H8	250	G G S Y D G F Y S M D Y W G Q G T S V T V S	SEQ. ID NO. 9	
6H4	10	D D - Y A M E Y - - - W G Q G T S V T V S	SEQ. ID NO. 10	
6H7	41	D E A Y - - - - - W G Q G T L V T V S	SEQ. ID NO. 11	
9B11	41	Y T S Y A M D Y - - - - - W G Q G T S V T V S	SEQ. ID NO. 12	
4G9	40	D F D Y - - - - - W G Q G T L T V S	SEQ. ID NO. 13	

FIG. 1A



Nombre del mAb	Regiones de CDR y RMSD (Å) de mAb6H4					
	L1	L2	L3	H1	H2	H3
mAb6H8	2,27	0,84	0,67	1,85	3,36	6,67
mAb4G9	2,44	0,88	3,72	1,39	3,59	7,22

FIG. 2

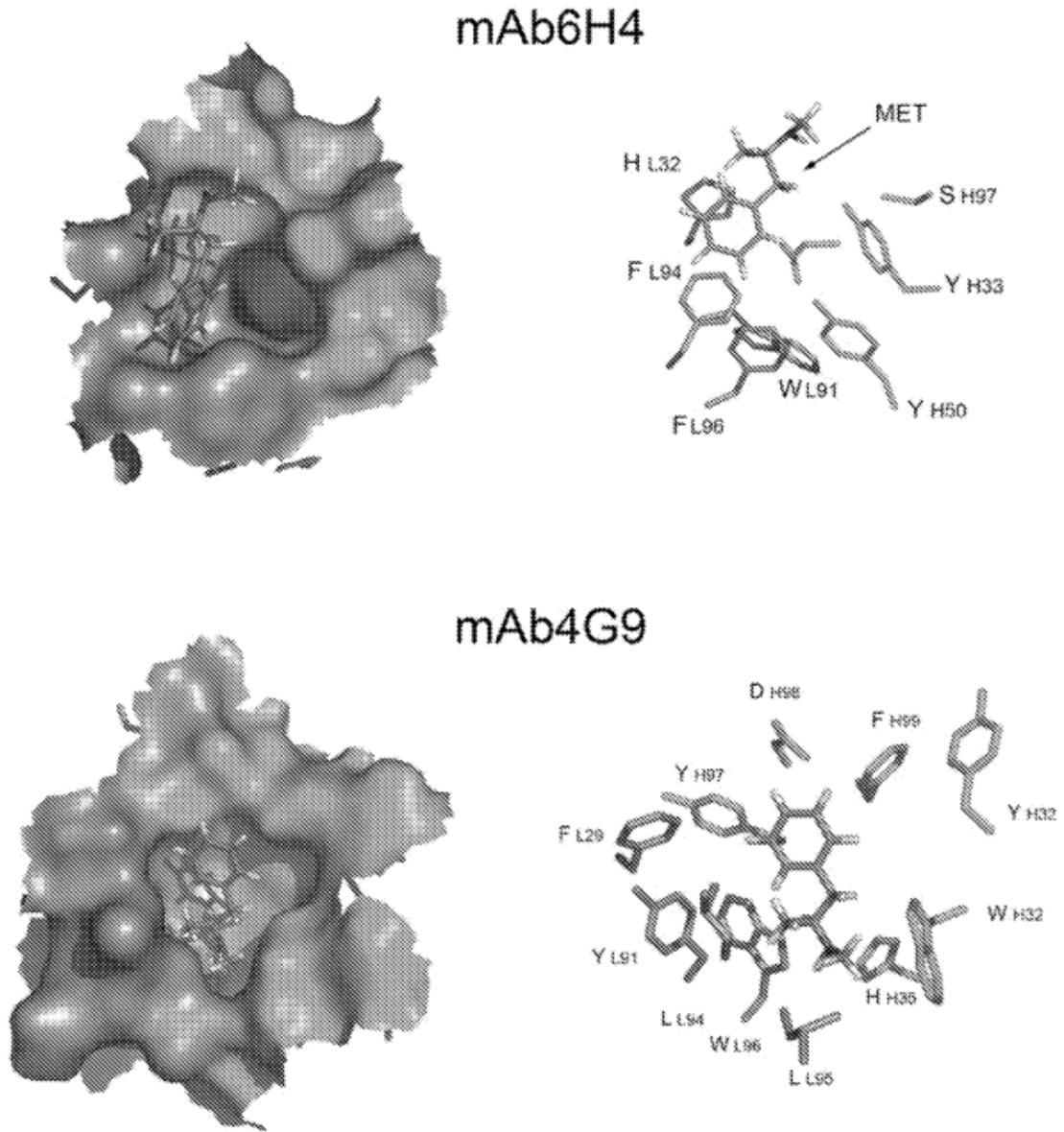


FIG. 3

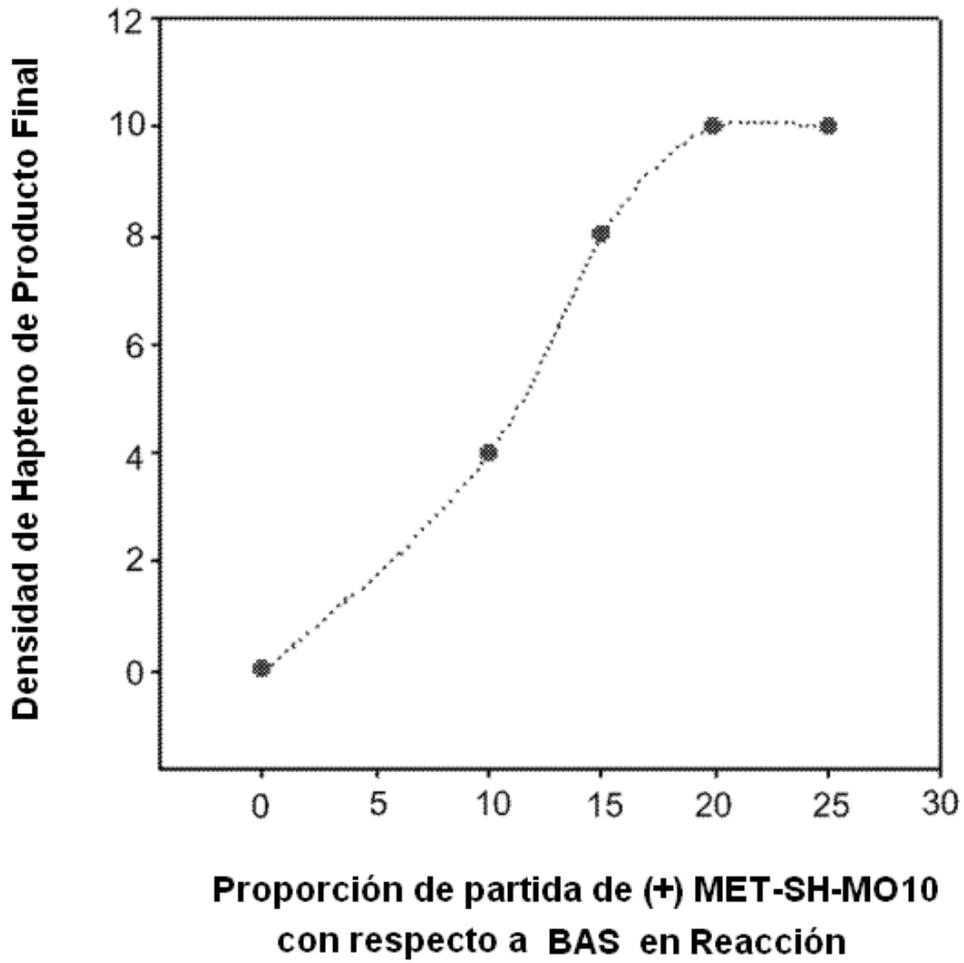


FIG. 4A

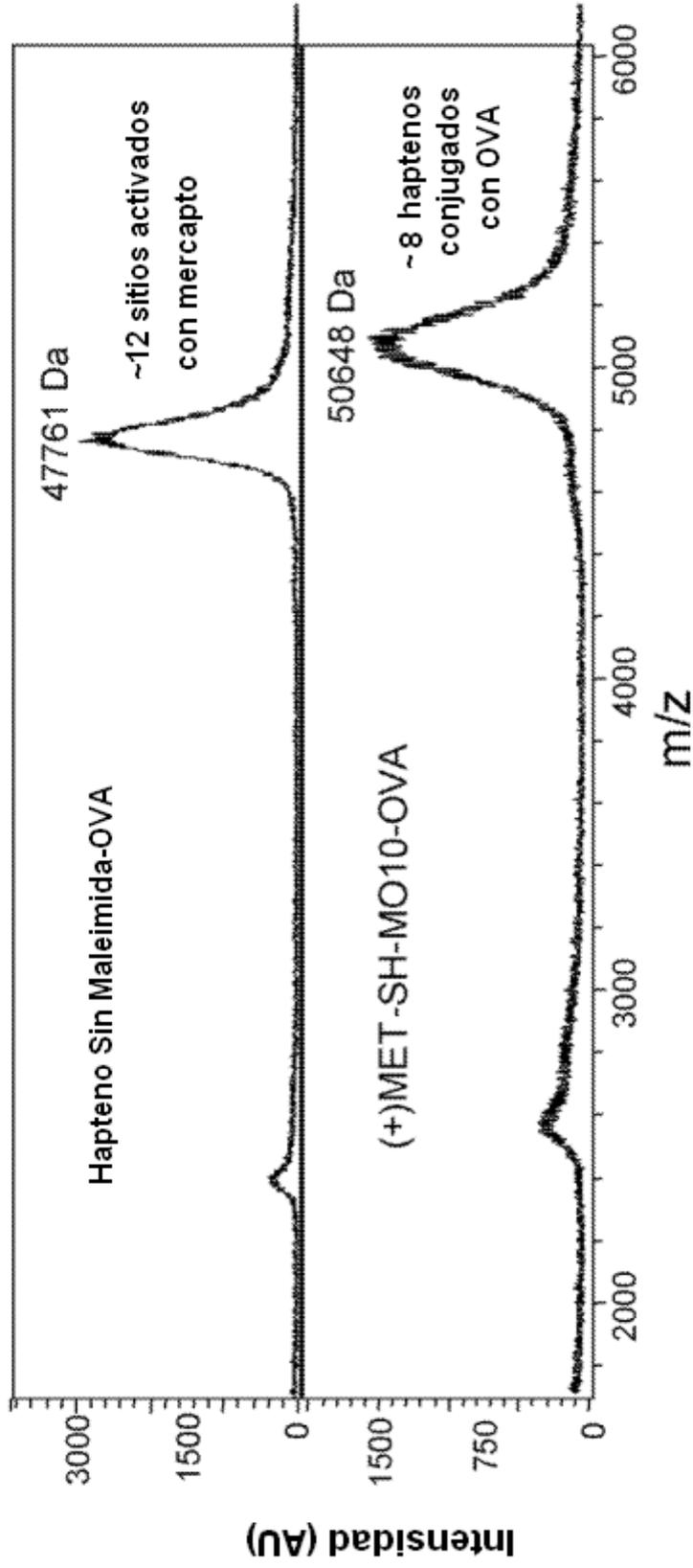


FIG. 4B

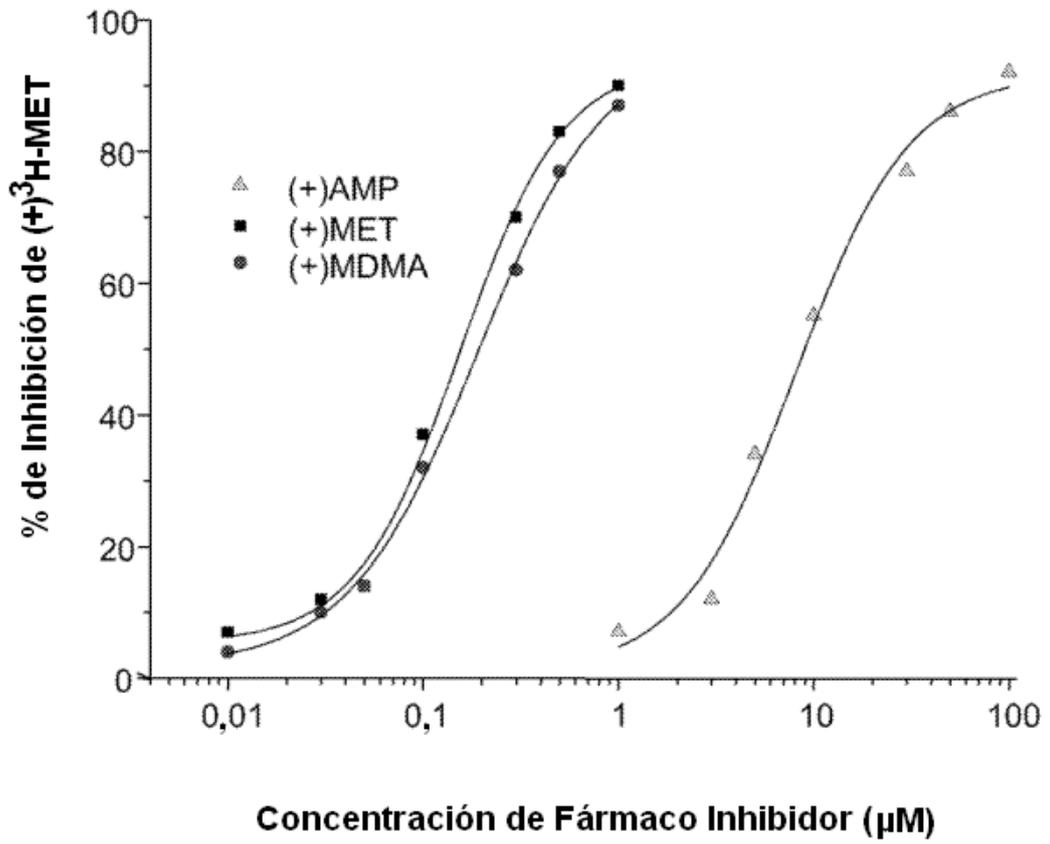


FIG. 4C

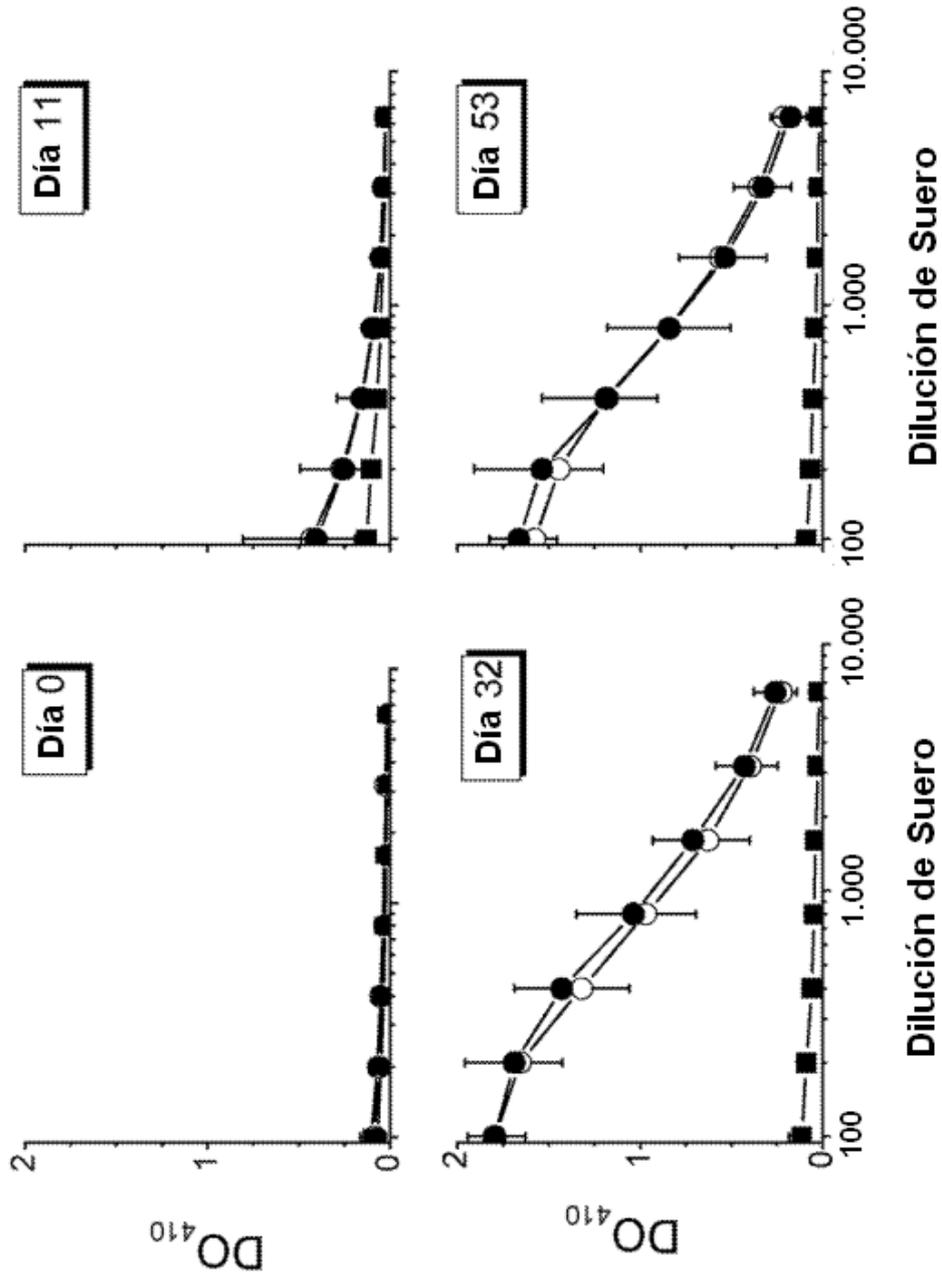


FIG. 5

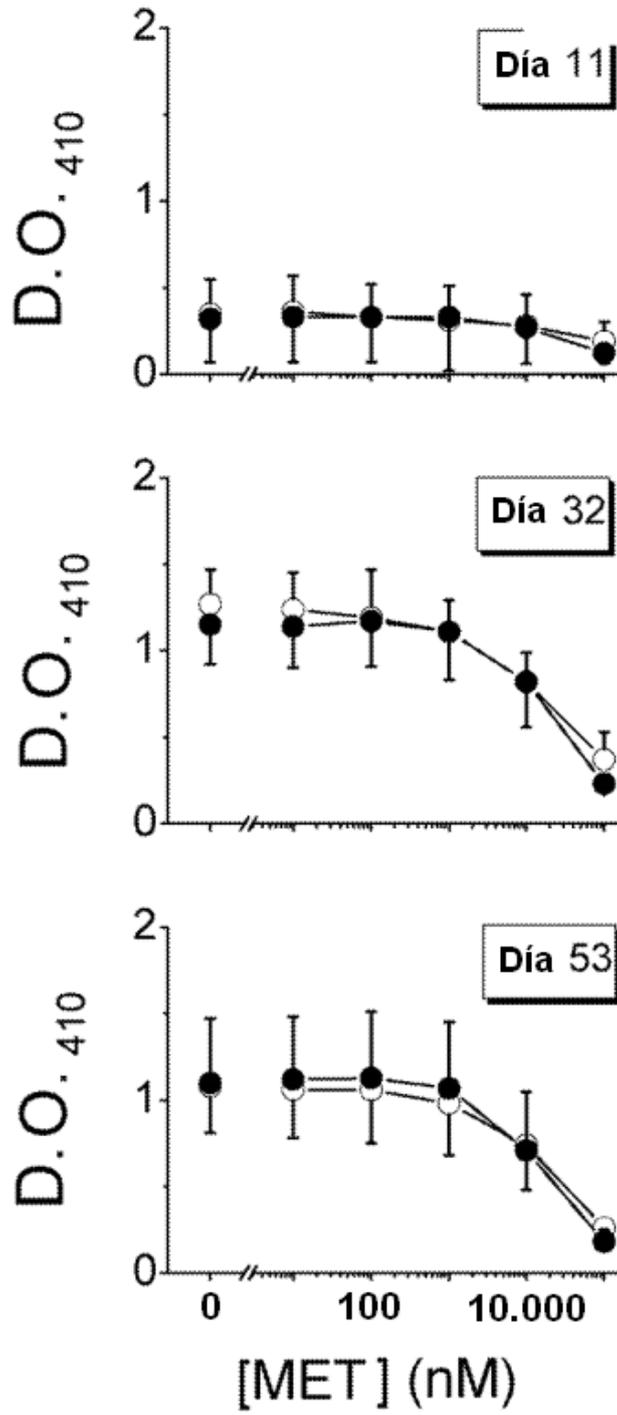


FIG. 6

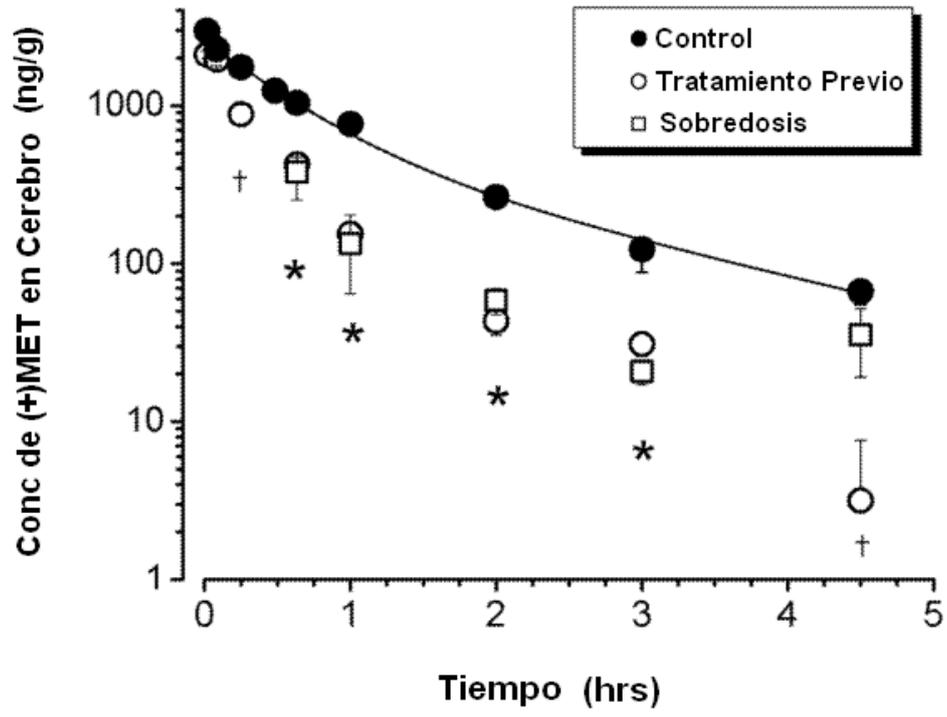


FIG. 7

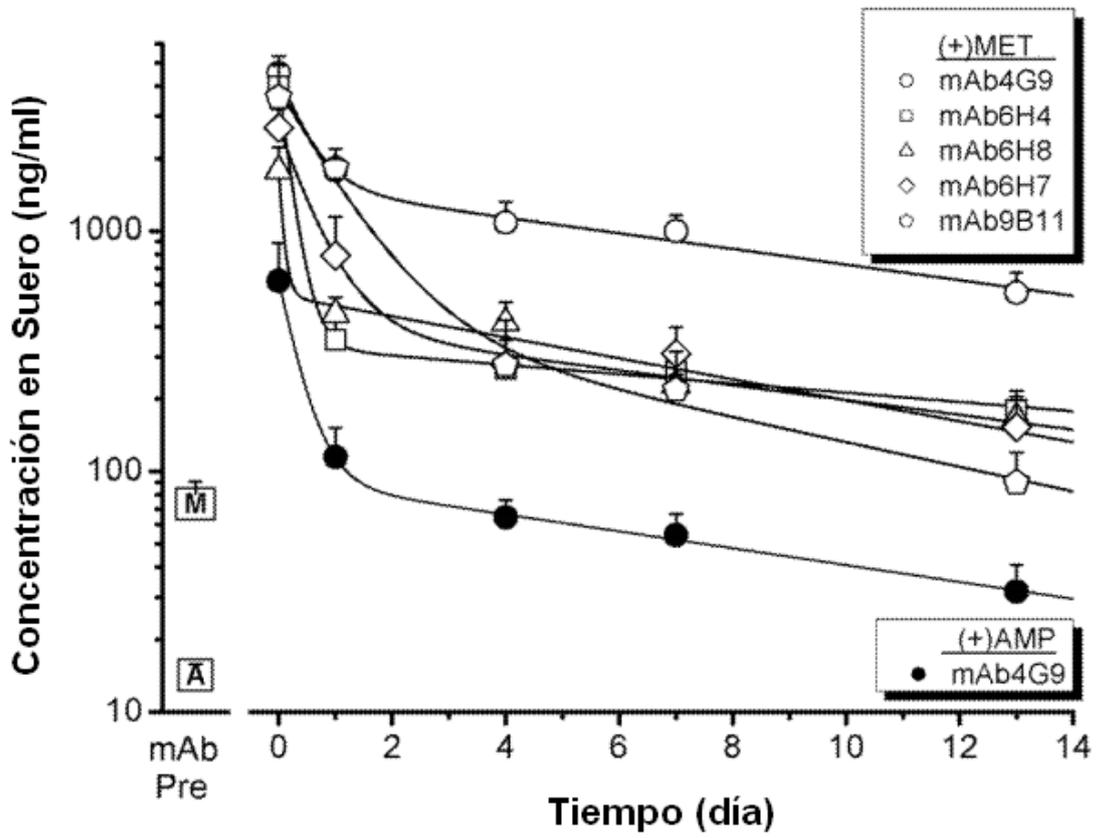


FIG. 8

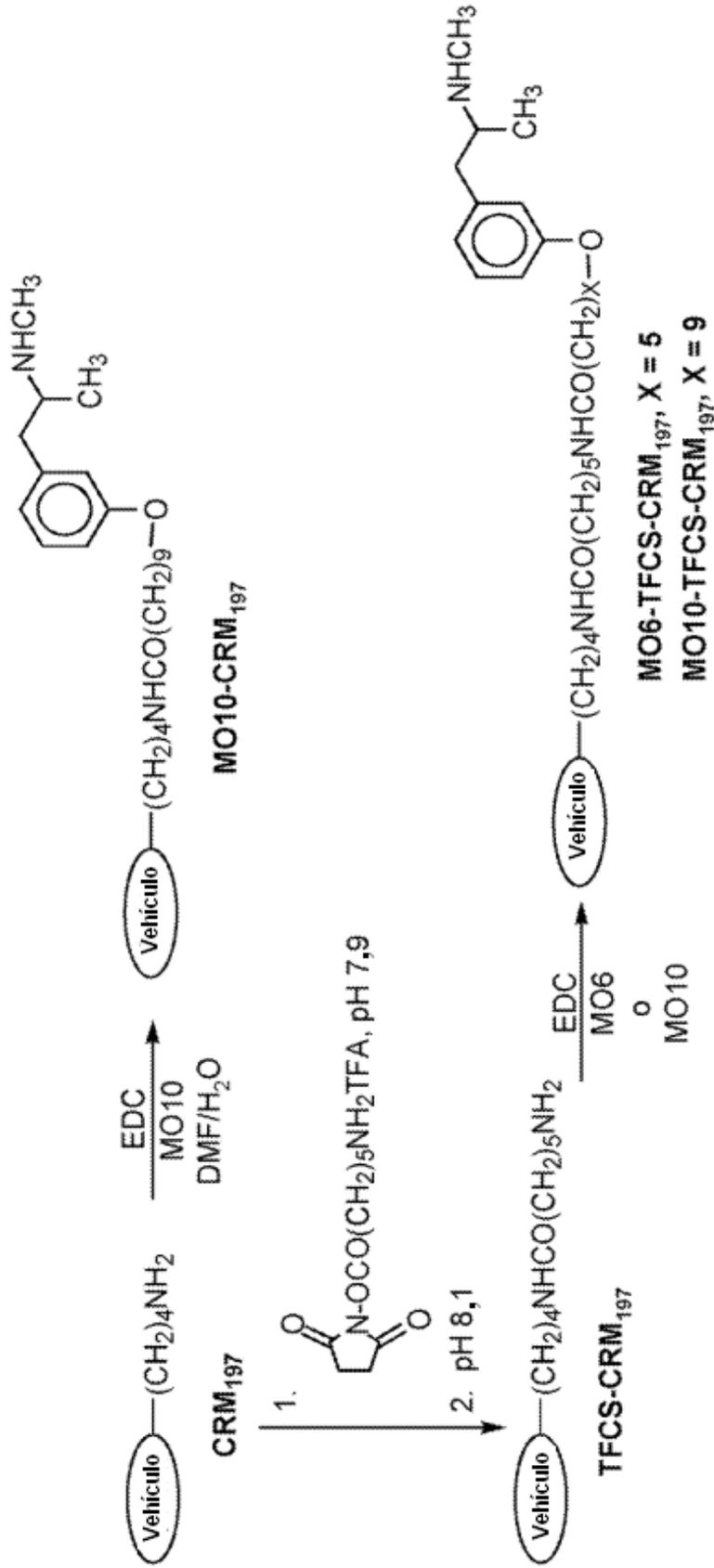


FIG. 9

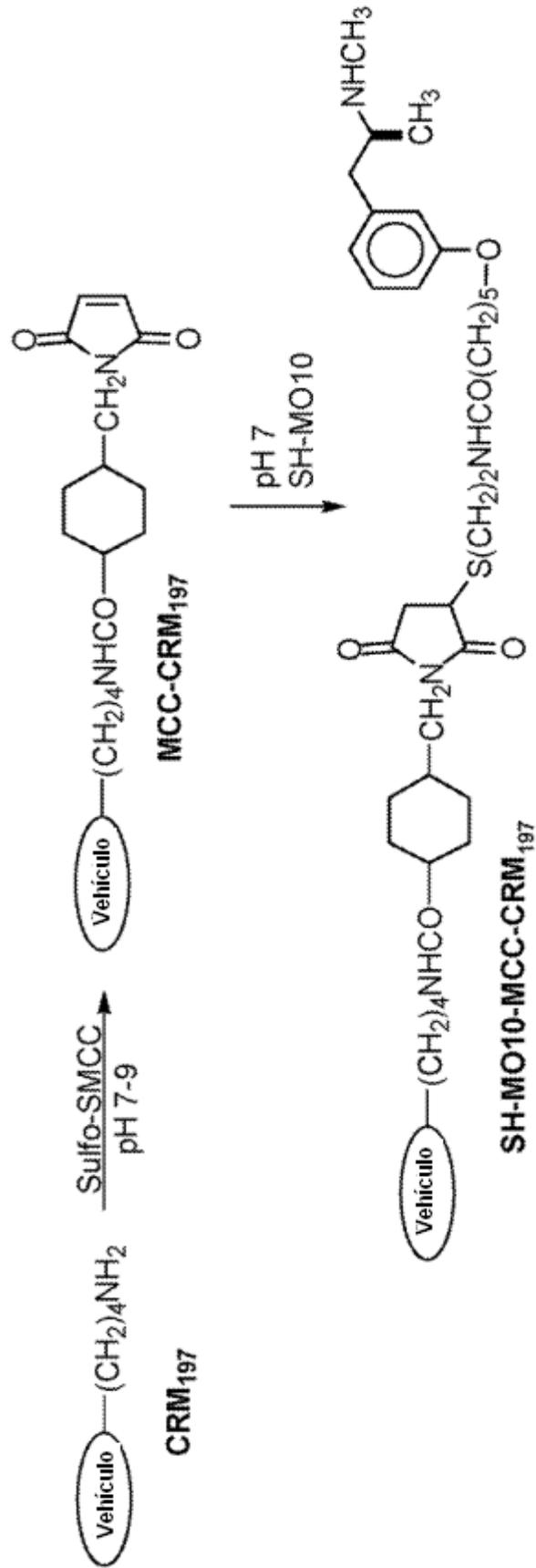


FIG. 10

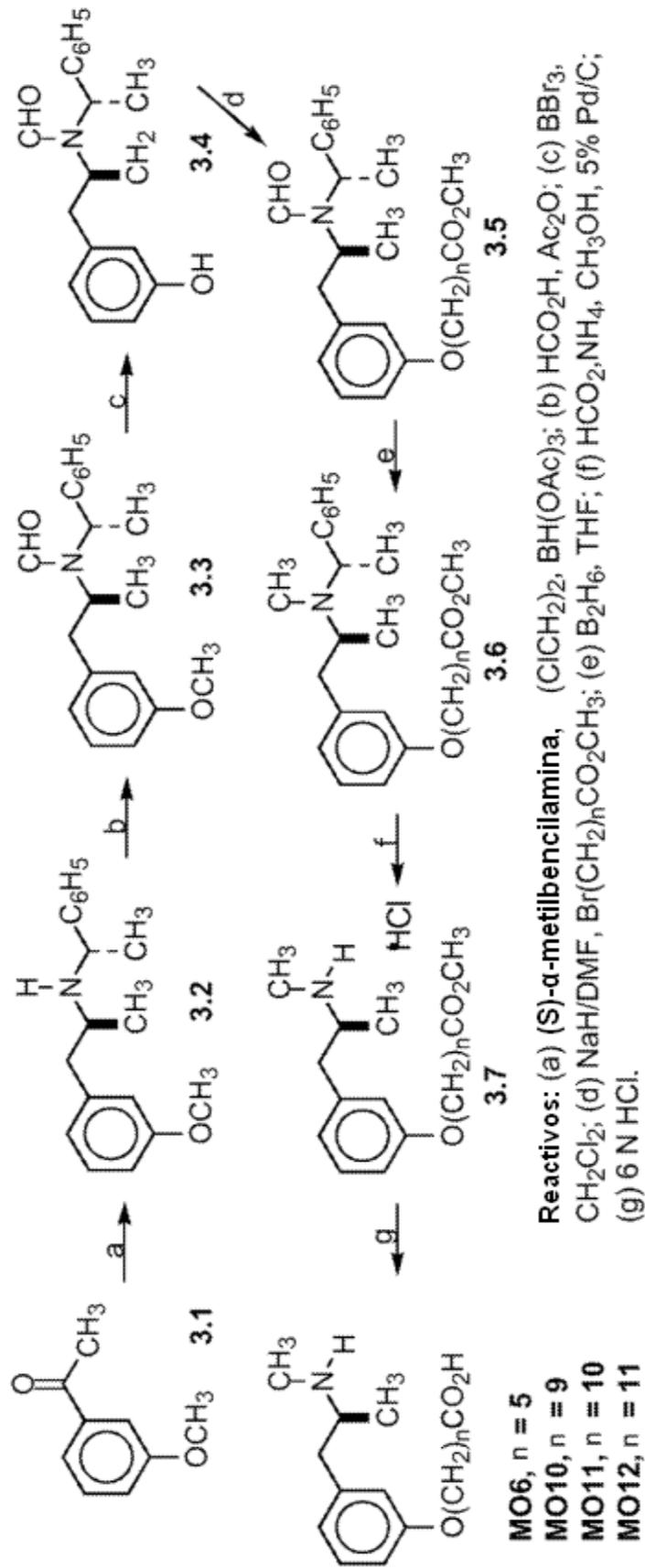
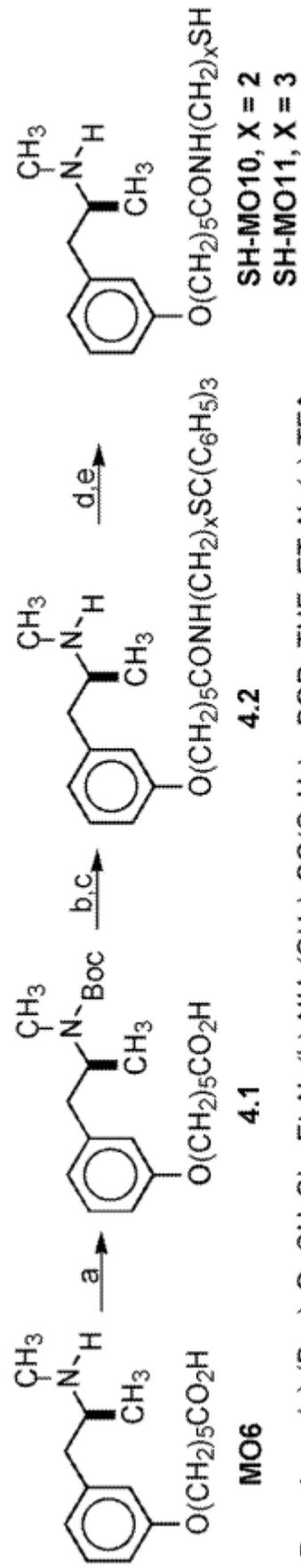


FIG. 11



Reactivos: (a) (Boc)₂O, CH₂Cl₂, Et₃N; (b) NH₂(CH₂)_xSC(C₆H₅)₃, BOP, THF, ET₃N; (c) TFA; (d) Hg(OAc)₂, EtOH; (e) H₂S, EtOH.

FIG. 12

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 7202348 B [0004]
 • US 60913124 B [0150]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15 • KABAT ; WU. J Immunol, 1991, vol. 147, 1709-1719 [0012]
 • HARLOW ; LANE. Antibodies. Cold Spring Harbor, 1988 [0074]
 • BYRNES-BLAKE *et al.*, Int Immunopharmacol, 2001, vol. 1, 329-338 [0104]
 • BLAKE *et al.* Eur J Pharmacol, 2003, vol. 461, 119-128 [0106]
 20 • VALENTINE *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 1994, vol. 269, 1079-1085 [0107] [0140]
 • VALENTINE *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 1996, vol. 278, 709-716 [0108]
 • HARDIN *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 1998, vol. 285, 1113-1122 [0108]
 • MCMILLAN *et al.*, Behav Pharmacol, 2002, vol. 13, 465-473 [0108]
 • OWENS *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 1988, vol. 246, 472-478 [0109] [0135]
 25 • AKERA ; CHENG. Biochim Biophys Acta, 1977, vol. 470, 412-423 [0109]
 • COLOMA *et al.*, J Immunol Methods, 1992, vol. 152, 89-104 [0122] [0123]
 • GIUDICELLI *et al.*, Nuc Acid Res, 2004, vol. 32, W435-440 [0124] [0126]
 • AL-LAZIKANI *et al.* J Mol Biol, 1997, vol. 273, 927-948 [0128]
 • WHITELEGG ; REES. Protein Eng, 2000, vol. 13, 819-824 [0129]
 30 • BYRNES-BLAKE *et al.*, Eur J Pharmacol, 2005, vol. 521, 86-94 [0145]