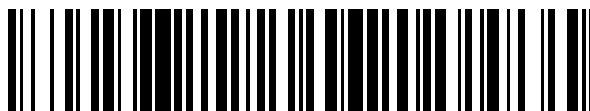


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 432**

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2008** **PCT/US2008/006591**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2008** **WO08153744**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2008** **E 08754680 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 2167963**

54 Título: **Transportadores poliméricos para inmunohistoquímica e hibridación in situ**

30 Prioridad:

23.05.2007 US 931546 P

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

15.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KOSMEDER, JERRY, W.;
KERNAG, CASEY, A.;
JOHNSON, DONALD y
BIENIARZ, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 731 432 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

Transportadores poliméricos para inmunohistoquímica e hibridación *in situ*

- 5 La presente solicitud reclama el beneficio de la fecha de presentación anterior de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/931.546, presentada el 23 de mayo de 2007.

CAMPO

- 10 La presente divulgación se refiere a conjugados moleculares, en particular conjugados específicos de Fc, que comprenden un transportador polimérico que tiene varios grupos funcionales reactivos, aspectos de la presente divulgación de un procedimiento para preparar conjugados ejemplares divulgados y aspectos de la presente divulgación de un procedimiento para usar los conjugados.

15 ANTECEDENTES

- Se pueden usar conjugados biomoleculares en inmunoensayos para detectar moléculas diana específicas en una muestra. Son conocidos diversos conjugados, incluyendo conjugados anticuerpo-marcador detectable y conjugados anticuerpo-enzima, y se han desarrollado varios procedimientos para preparar estos conjugados. Por ejemplo, los
20 conjugados de anticuerpos a menudo se preparan usando reactivos de acoplamiento que tienen al menos dos grupos reactivos. Uno de los grupos se usa para acoplarse al anticuerpo, y otro grupo funcional se acopla al marcador detectable. Estas reacciones de acoplamiento pueden interferir con el rendimiento del conjugado para un propósito deseado. Por ejemplo, el acoplamiento puede desactivar los conjugados anticuerpo-enzima, tal como a través de efectos estéricos, desactivación de grupos funcionales reactivos críticos para el funcionamiento apropiado, cambios
25 en la solubilidad, etc. Como resultado, y a pesar de los esfuerzos previos, todavía existe la necesidad de obtener conjugados moleculares, y procedimientos para su producción y uso, que proporcionen mayor sensibilidad de ensayo.

- Ventana Medical es el cesionario de varias patentes y solicitudes en esta área general, incluyendo: solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/018.897, titulada "Microwave Mediated Synthesis of Nucleic Acid Probes", publicada como
30 publicación de EE. UU. n.º 2005/0158770, el 21 de julio de 2005; solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/739,794, presentada el 23 de noviembre de 2005, y la correspondiente solicitud de modelo de utilidad, n.º 11/603.425, titulada "Molecular Conjugate"; solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/856.133, y la correspondiente solicitud de modelo de utilidad, n.º 11/982.627, titulada "Haptens, Hapten Conjugates, Compositions Thereof and Method for their Preparation and Use". El ejemplo 12 de la patente '897 divulga un procedimiento para preparar poli(acrilamida-hidracida). La solicitud
35 de patente '897 establece que la "invención proporciona un procedimiento para preparar una citosina marcada, una citidina marcada o biomolécula que contiene citidina marcada, tal como oligonucleótidos, moléculas de ADN, moléculas de ARN, proteínas, péptidos u otras biomoléculas". Publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0158770, párrafo 0044. Además, la solicitud establece que "los polímeros lineales que están funcionalizados con fluoróforos y grupo(s) nucleófilo(s) también pueden funcionar como restos que contienen indicadores útiles". Y "un polímero
40 funcionalizado preferente es poli(acrilamida-hidracida) funcionalizada con fluoróforos, en particular PAH de PM 10.000 a 20.000 que porta entre 10 a 40 grupos hidracida por cadena polimérica". Publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0158770, párrafo 0068. Los grupos indicadores se definen por incluir "cualquier resto detectable usado comúnmente para marcar sondas", incluyendo haptenos y proteínas. Publicación de patente de EE. UU. n.º
45 2005/0158770, párrafo 0053.

- De acuerdo con el esquema 11 de la solicitud '425, la porción Fc de un anticuerpo se oxida para formar un aldehído, y a continuación se acopla una hidracida *tiolada* a la porción Fc del anticuerpo por reacción de un nitrógeno de hidracida con el carbonilo. De acuerdo con el esquema 13 de la solicitud '425, una hidracida tiolada acoplada a la
50 porción Fc oxidada de un anticuerpo se hace reaccionar con fosfatasa alcalina que tiene un grupo funcional reactivo de tiol para formar un conjugado. Y, de acuerdo con el esquema 19, en primer lugar se sintetiza una poli(acrilamida-hidracida), y a continuación, como se establece en el ejemplo 22:

- En un disolvente apropiado, se hace reaccionar el PAH resultante con un agente tiolante, tal como tiol-dPEG-éster NHS (los solicitantes destacan que el reactivo se debe denominar S-acetil-dPEG-éster NHS) (Quanta Biodesign,
55 Powell, OH) o reactivo de Traut, para tiolar una porción (por ejemplo, aproximadamente un 50-75 %) de hidracidas disponibles ($z = 5$ a 40) y proporcionar un conector de hidracida-tiol multifuncional polimérico que se puede usar en el procedimiento divulgado.

- Como se entiende actualmente, todos los aspectos de la divulgación de los conjugados PAH divulgados en la solicitud
60 '897 tienen al menos una porción de los grupos funcionales hidracida reactivos tiolados como se divulga en el ejemplo 22. Además, es el grupo tiol, proporcionado por la tiolación de la hidracida, que es el resto reactivo usado para formar conjugados.

- El documento US 2005/158770 A1 divulga un procedimiento para preparar una sonda de ácido nucleico.

- 65 Buchwalow, I. B., Minin, E. A. y Boecker, W. "A multicolor fluorescence immunostaining technique for simultaneous

antigen targeting", ACTA HISTOCHEMICAL, vol. 107, 2005, páginas 143-148, divulga un protocolo universal básico para el uso de anticuerpos secundarios que reconocen selectivamente diferentes isotipos/subclases de un anticuerpo primario monoclonal.

- 5 Bocker W. *et al.* "Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: A new cell biological concept", LABORATORY INVESTIGATION, vol. 82, 2002, páginas 737-745, divulga una función de células madre precursoras o diferenciadas de la célula positiva para Ck5 que es responsable de la regeneración del epitelio de mama adulto humano.
- 10 Bocker W. *et al.* "Usual ductal hyperplasia of the breast is a committed stem (progenitor) cell lesion distinct from atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ", JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 198, 2002, páginas 458-467 divulga que las células que experimentan una transformación maligna tienden a estar bastante avanzadas en la estirpe glandular de la diferenciación.
- 15 Pitt J. Christian *et al.* "Haptenylation of antibodies during affinity purification: A novel and convenient procedure to obtain labeled antibodies for quantification and double labeling", HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 110, 1998, páginas 311-322, divulga un procedimiento para la haptenilación de anticuerpos policlonales que combina purificación y haptenilación.
- 20 Härtig W. *et al.* "Simultaneous detection of tau phospho-epitopes with haptenylated antibodies", NEUROREPORT, vol. 17, 2006, páginas 869-874, divulga que se mostró que anticuerpos y sus derivados biotinilados eran marcadores sensibles para la detección inmunohistoquímica de alteraciones neuropatológicas durante la enfermedad de Alzheimer.
- 25 Torchilin V. P. "Polymer contrast agents for medical imaging", CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, vol. 1, 2000, páginas 183-215, divulga el uso de polímeros poliquelantes modificados en un extremo con un residuo fosfolipídico hidrófobo para dar polímeros anfifílicos en liposomas y micelas.

El documento WO 2008/063378 A2 divulga un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico multiplexado, tal como para dos o más dianas diferentes.

El documento WO 2008/140452 A1 divulga composiciones de hidracina extendida de forma conjugada de la fórmula $(RR_2)N(H)n(NH_2)_n$, composiciones de hidrazona fluorescentes de la fórmula $(RR_2)NN=C(R_1R_2)$, procedimientos de formación de hidrazonas a partir de la reacción de hidracinas extendidas de forma conjugada con carbonilos extendidos de forma conjugada,

El documento EP 2 444 804 A2 divulga marcas elementales basadas en conjugados metal-polímero que se proporcionan para análisis elemental de analitos.

40 SUMARIO

La presente invención es como se establece en las reivindicaciones.

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a la síntesis, derivatización, conjugación con inmunoglobulinas y amplificación de señal basada en polímeros discretos relativamente cortos, por ejemplo, poliacrilamida-hidracida (PAH), que tienen varios grupos funcionales reactivos que reaccionan con varias moléculas de interés. Muchos de los aspectos divulgados de la presente divulgación se refieren a polímeros sustancialmente solubles en agua, o completamente solubles en agua. Con referencia al PAH ejemplar, dichos polímeros son completamente solubles en agua y pueden presentar numerosas hidracidas reactivas, tales como grupos funcionales hidracida superiores a cero, y más típicamente de aproximadamente 5 hasta al menos 100 grupos hidracida. Los grupos funcionales reactivos también se pueden cuantificar con referencia al porcentaje de posiciones potenciales ocupadas por el grupo funcional pertinente, tal como una hidracida. Para los aspectos de la presente divulgación, el grupo funcional reactivo comprende típicamente al menos un 10 %, y hasta al menos un 50 %, de las posiciones posibles que pueden ser grupos funcionales reactivos. Los grupos funcionales reactivos, tales como la hidracida, se pueden derivatizar con una variedad de haptenos. Las hidracidas restantes en el transportador se pueden conjugar directamente con el carbohidrato oxidado de la región Fc del anticuerpo. El pKa bajo de la hidracida ofrece una ventaja particular ya que la protonación de los grupos aldehídos generados por la oxidación de carbohidrato del anticuerpo facilita la conjugación del transportador de hapteno polimérico. Además, el transportador se instala en la región Fc del anticuerpo, lejos del sitio de unión de la IgG. El conjugado resultante presenta una amplificación de señal muy grande en comparación con las basadas en Fc derivatizados con haptenos individuales.

Un aspecto del procedimiento divulgado se refiere a la formación de un conjugado molecular acoplando una molécula de unión específica a un marcador detectable a través de grupos funcionales hidracida reactivos proporcionados por un transportador de poliacrilamida-hidracida. La poliacrilamida-hidracida es preferentemente soluble en agua. El peso molecular promedio de la porción polimérica puede variar, y típicamente es de tan solo 50 hasta al menos aproximadamente 100.000, más típicamente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000, e incluso más

típicamente de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 40.000. Determinadas divulgaciones usan poliacrilamida-hidrácidas que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 o menos. Y, para divulgaciones particulares, el grupo funcional hidrácida de la poliacrilamida-hidrácida no está tiolado.

- 5 Un aspecto particular de la presente divulgación comprende formar un primer compuesto acoplando la molécula de unión específica a al menos una porción de los grupos funcionales reactivos. Al menos una porción de los grupos funcionales reactivos restantes del primer compuesto se puede acoplar a continuación a un marcador detectable, tal como un hapteno. De forma alternativa, un transportador polimérico que comprende varios grupos funcionales reactivos se puede acoplar a un marcador detectable, tal como hapteno. Al menos una porción de los grupos
10 funcionales reactivos restantes del primer compuesto se puede acoplar a continuación a una molécula de unión específica.

- Los aspectos particulares de la presente divulgación se refieren a anticuerpos como la molécula de unión específica. Para un ejemplo de la divulgación, el transportador polimérico se puede acoplar a la porción Fc del anticuerpo a través
15 de los grupos funcionales hidrácida reactivos. El anticuerpo se puede activar para reaccionar con los grupos funcionales reactivos, tal como modificando químicamente una porción glucosilada del anticuerpo. En determinados aspectos de trabajo de la presente divulgación, el anticuerpo se activa químicamente por oxidación para formar un compuesto que porta carbonilo, tal como un aldehído.

- 20 Muchos de los aspectos divulgados de la presente divulgación se refieren al uso de haptenos como marcador detectable. El hapteno puede ser cualquier hapteno conocido ahora o descubierto o desarrollado a partir de ahora que sea adecuado para practicar aspectos divulgados de la presente divulgación del procedimiento. Son conocidos muchos haptenos y se usan con frecuencia para procedimientos analíticos, tales como dinitrofenilo, biotina, digoxigenina, fluoresceína, rodamina o combinaciones de los mismos. Se han desarrollado específicamente otros
25 haptenos por Ventana Medical Systems, incluyendo haptenos seleccionados de oxazoles, pirazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofuranos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenoides, cumarinas, ciclolignanos y combinaciones de los mismos. Se pueden acoplar varios haptenos diferentes al transportador polimérico. Además, se pueden acoplar compuestos, tales como haptenos, al transportador polimérico usando un conector, tal como un conector NHS-PEG.

- 30 Una divulgación específica se refiere a un procedimiento para formar un conjugado molecular, que comprende acoplar una molécula de unión específica a un marcador detectable por un transportador de poliacrilamida-hidrácida. El transportador tiene un peso molecular promedio de 10.000 o menos y varios grupos funcionales hidrácida no tiolados reactivos.

- 35 Una divulgación actualmente preferente que usa transportadores de poliacrilamida-hidrácida comprende proporcionar un transportador polimérico de poliacrilamida, que tiene típicamente un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 o menos, y que comprende varios grupos funcionales hidrácida no tiolados reactivos. La porción Fc de un anticuerpo se oxida para formar un aldehído. El transportador polimérico se acopla a la porción Fc oxidada del anticuerpo a través de al menos un grupo funcional hidrácida reactivo para formar un primer compuesto. El primer
40 compuesto se acopla a continuación a al menos un hapteno a través de un grupo funcional hidrácida reactivo para formar un segundo compuesto.

- La presente divulgación también se refiere a un conjugado que comprende poliacrilamida-hidrácidas. Para un aspecto de la divulgación, una divulgación de conjugado divulgado comprende una molécula de unión específica unida
45 covalentemente a un marcador detectable a través de un grupo funcional hidrácida reactivo proporcionado por un conector de poliacrilamida-hidrácida. El conjugado también puede comprender un conector de hidrácida basado en PEG, tal como compuestos que tienen un extremo funcionalizado y un extremo distal que comprende un grupo funcional hidrácida o derivado de hidrácida. El marcador detectable típicamente se selecciona de una enzima, un fluoróforo, un luminóforo, una molécula luminiscente, un hapteno, una nanopartícula fluorescente, o combinaciones de los mismos. Las enzimas ejemplares incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante. Los haptenos conocidos ejemplares incluyen dinitrofenilo, biotina, digoxigenina, fluoresceína, rodamina o combinaciones de los mismos. Haptenos ejemplares adicionales, desarrollados por Ventana Medical, incluyen oxazoles, pirazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofuranos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenoides, cumarinas, ciclolignanos o combinaciones de los mismos. La molécula de unión específica a menudo es un anticuerpo, incluyendo anticuerpos antihapteno y
50 anticuerpos antianticuerpo.

- También se pueden usar transportadores de poliacrilamida-hidrácida en un procedimiento de ensayo de diagnóstico. Una divulgación de un procedimiento de este tipo comprende poner en contacto una muestra con una molécula de unión específica que se une específicamente a una diana. La molécula de unión específica se conjuga con un
60 marcador detectable a través del transportador de poliacrilamida-hidrácida. La molécula de unión específica se detecta a continuación usando el marcador detectable. Los conjugados divulgados también se pueden usar en un ensayo multiplexado. Para un aspecto de la divulgación, incluye un ensayo de diagnóstico multiplexado para dos o más dianas diferentes en una muestra, donde el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con dos o más moléculas de unión específica que se unen específicamente a dos o más dianas diferentes. Las dos o más moléculas de unión
65 específica se conjugan con diferentes haptenos a través de un grupo funcional hidrácida reactivo de un transportador de poliacrilamida-hapteno. A continuación se pone en contacto la muestra con dos o más anticuerpos antihapteno

diferentes que se pueden detectar por separado.

Aunque determinados aspectos divulgados de la presente divulgación se refieren en particular al uso de transportadores de poliacrilamida-hidracida, también se contemplan otros transportadores polímeros. Para estos aspectos de la presente divulgación, un procedimiento divulgado para formar un conjugado molecular comprende acoplar una molécula de unión específica a un marcador detectable a través de grupos funcionales reactivos proporcionados por un transportador polimérico. El transportador polimérico comprende una porción polimérica seleccionada de poli(ácidos acrílicos), polietileniminas, polisacáridos, poli(etilenos-alt-ácidos maleicos), poliaminoácidos o polivinilpirrolidonas. La porción polimérica también incluye varios grupos funcionales reactivos seleccionados de hidracinas, hidracidas, derivados de hidracina, derivados de hidracida, guanidinas, aminoguanidinas, hidroxilaminas, o combinaciones de los mismos. Las especies de polisacáridos ejemplares se pueden seleccionar de carbohidratos, celulosa, carboximetilcelulosa, dextrano, glucógeno, poli(ácido hialurónico) y almidón. Los poliaminoácidos se pueden seleccionar de poli(arginina), poli(asparagina), poli(ácido aspártico), poli(ácido glutámico), poli(glutamina), poli(lisina) o combinaciones de los mismos.

Para aspectos particulares de la presente divulgación, el procedimiento comprende formar un primer compuesto acoplando la molécula de unión específica a al menos una porción de los grupos funcionales reactivos. Al menos una porción de cualquier grupo funcional no reaccionado restante del primer compuesto se acopla a un marcador detectable. De forma alternativa, el procedimiento puede comprender formar un primer compuesto acoplando un marcador detectable a al menos una porción de los grupos funcionales reactivos, y a continuación acoplar al menos una porción de los grupos funcionales reactivos restantes del primer compuesto a una molécula de unión específica.

Una clase de moléculas de unión específica son los anticuerpos. El procedimiento puede comprender acoplar el transportador polimérico a la porción Fc del anticuerpo a través de un grupo funcional reactivo. De nuevo, el anticuerpo se puede activar para reaccionar con los grupos funcionales reactivos, tal como modificando químicamente una porción glucosilada del anticuerpo.

La molécula de unión específica puede ser un anticuerpo y el marcador detectable puede ser un hapteno, como se describe con referencia a los transportadores de poliacrilamida-hidracida. Se pueden acoplar varios haptenos diferentes al transportador polimérico, y uno cualquiera o más de dichos haptenos se pueden acoplar al transportador usando un conector, tal como un conector basado en PEG.

Un aspecto particular de la presente divulgación del procedimiento para formar un conjugado comprende proporcionar un transportador polimérico que comprende una porción polimérica seleccionada de poli(ácidos acrílicos), polietileniminas, polisacáridos, poli(etilenos-alt-ácidos maleicos), poliaminoácidos o polivinilpirrolidonas. La porción polimérica incluye varios grupos funcionales reactivos seleccionados de hidracinas, hidracidas, derivados de hidracina, derivados de hidracida, guanidinas, aminoguanidinas, hidroxilaminas, o combinaciones de los mismos. La porción Fc de un anticuerpo se oxida para formar un aldehído. El transportador polimérico se acopla a la porción Fc oxidada del anticuerpo y a al menos un hapteno, y potencialmente varios haptenos diferentes, a través de grupos funcionales reactivos.

Una divulgación del procedimiento comprende formar un conjugado molecular proporcionando un transportador polimérico que comprende una porción polimérica seleccionada de poli(ácidos acrílicos), polietileniminas, polisacáridos, poli(etilenos-alt-ácidos maleicos), poliaminoácidos o polivinilpirrolidonas. La porción polimérica también incluye varios grupos funcionales reactivos seleccionados de hidracinas, hidracidas, derivados de hidracina, derivados de hidracida, guanidinas, aminoguanidinas, hidroxilaminas, o combinaciones de los mismos. Una molécula de unión específica se acopla al transportador polimérico a través de un grupo funcional reactivo. Un hapteno también se acopla al transportador polimérico a través de un grupo funcional reactivo, seleccionándose el hapteno de oxazoles, pirazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofuranos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenoides, cumarinas, ciclolignanos y combinaciones de los mismos.

También se describen conjugados moleculares que comprenden transportadores poliméricos distintos de poliacrilamida-hidracidas. Los conjugados ejemplares comprenden una molécula de unión específica acoplada a un marcador detectable a través de un transportador polimérico que comprende una porción polimérica seleccionada de poliacrilamida-N-hidroxisuccinimida, poli(ácidos acrílicos), polietileniminas, polisacáridos, poli(etilenos-alt-ácidos maleicos), poliaminoácidos o polivinilpirrolidonas. Se puede encontrar información adicional sobre materiales poliméricos de poliacrilamida-N-hidroxisuccinimida en Pollack *et al.*, "Enzyme Immobilization by Condensation Copolymerization into Cross-Linked Polyacrylamide Gels," JACS, vol. 102, páginas 6324-6336. El transportador también incluye varios grupos funcionales reactivos seleccionados de hidracinas, hidracidas, derivados de hidracina, derivados de hidracida, guanidinas, aminoguanidinas, hidroxilaminas, o combinaciones de los mismos. Las especies de polisacáridos ejemplares incluyen carbohidratos, celulosa, carboximetilcelulosa, dextrano, glucógeno, poli(ácido hialurónico) y almidón. Determinadas divulgaciones también usan especies oxidadas, en particular polisacáridos oxidados. Para un aspecto de la divulgación, se puede oxidar dextrano usando un agente oxidante adecuado, incluyendo peryodato o halógenos, tales como bromo, para producir una especie que porta carbonilo, típicamente un aldehído, pero potencialmente otras especies que portan carbonilo, tales como cetonas. Los poliaminoácidos ejemplares incluyen poli(arginina), poli(asparagina), poli(ácido aspártico), poli(ácido glutámico), poli(glutamina) y

poli(lisina). El transportador también puede ser una poli(guanidina) o poli(aminoguanidina).

Como con las poliacrilamida-hidrácidas, se pueden usar otros transportadores poliméricos divulgados para realizar un ensayo de diagnóstico para una diana en una muestra. Determinados aspectos divulgados de la presente divulgación comprenden poner en contacto la muestra con una molécula de unión específica que se une específicamente a una diana, en la que la molécula de unión específica se conjuga con un marcador detectable a través de un transportador polimérico que comprende una porción polimérica seleccionada de poli(ácidos acrílicos), polietileniminas, polisacáridos, poli(etilenos-alt-ácidos maleicos), poliaminoácidos o polivinilpirrolidonas. El transportador polimérico incluye varios grupos funcionales reactivos seleccionados de hidracinas, hidrácidas, derivados de hidracina, derivados de hidracida, guanidinas, aminoguanidinas, hidroxilaminas, o combinaciones de los mismos. La molécula de unión específica se detecta usando el marcador detectable. Un aspecto de la presente divulgación de un ensayo de diagnóstico multiplexado para dos o más dianas diferentes en una muestra comprende poner en contacto una muestra con dos o más moléculas de unión específica que se unen específicamente a dos o más dianas diferentes. Las dos o más moléculas de unión específica se conjugan con diferentes haptenos a través de un transportador de hapteno polimérico que tiene una porción polimérica seleccionada de poliacrilamida-N-hidroxisuccinimidas, poli(ácidos acrílicos), polietileniminas, polisacáridos, poli(etilenos-alt-ácidos maleicos), poliaminoácidos o polivinilpirrolidonas. Como con otras divulgaciones, el transportador polimérico también incluye varios grupos funcionales reactivos seleccionados de hidracinas, hidrácidas, derivados de hidracina, derivados de hidracida, guanidinas, aminoguanidinas, hidroxilaminas, o combinaciones de los mismos. A continuación se pone en contacto la muestra con dos o más anticuerpos antihapteno diferentes que se pueden detectar por separado.

También se proporcionan comparaciones de resultados de tinción, estableciéndose la detección génica individual usando la divulgación de PAH ejemplar. De forma similar, la señal de puntos cuánticos funcionalizados con estreptavidina se potencia mucho en el transportador de biotina polimérico derivatizado con Fc en Fc. Bajo hibridación *in situ* de la sonda génica ADN HER2, el transportador de biotina polimérico en Fc potencia la detección de la señal de punto cuántico en comparación con un enlace de biotina no polimérico. Determinados aspectos divulgados de la presente divulgación se refieren a un transportador de hapteno polimérico particular, a saber, PAH; sin embargo, se pueden sintetizar y usar muchos transportadores diferentes como se divulga en el presente documento. Estos incluyen, a modo de aspecto de la divulgación y sin limitación, poliacrílico, poliglucósido, poliglutamatos, polilisinas, poliaspartatos adecuadamente derivatizados con los haptenos se pueden usar todos. De forma similar, el alcance de la divulgación no se limita a sistemas basados en biotina-estreptavidina. Más bien, también se puede usar una amplia variedad de haptenos y los correspondientes anticuerpos conjugados con las entidades generadoras de señal, por ejemplo, enzimas, nanopartículas, puntos cuánticos, fluoróforos, quimioluminóforos, para el aspecto divulgado de la presente divulgación.

Los anteriores y otros objetivos, rasgos y ventajas de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 ilustra una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado de anticuerpo haptenilado específico de Fc.

La FIG. 2 ilustra un modo de realización de un procedimiento para sintetizar un conjugado polímero-polihapteno funcionalizado con Ab-hidrácida específico de Fc.

La FIG. 3 es una fotografía que ilustra la tinción de Ki-67 en amígdala (filtro de 655 nm; aumento de 20X) usando un conjugado estreptavidina-punto cuántico 655 con el anticuerpo biotinilado específico de Fc.

La FIG. 4 es una fotografía que ilustra la tinción de Ki-67 en amígdala (filtro de 655 nm; aumento de 20X) usando un conjugado estreptavidina-punto cuántico 655 con el anticuerpo de poliacrilamida-hidrácida biotinilado.

La FIG. 5 es una fotografía que ilustra la tinción de una dilución 1:10 de Ki-67 en amígdala (filtro de 655 nm; aumento de 20X) usando un conjugado estreptavidina-punto cuántico 655 con el anticuerpo biotinilado específico de Fc.

La FIG. 6 es una fotografía que ilustra la tinción de una dilución 1:10 de Ki-67 en amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 20X) usando un conjugado estreptavidina-punto cuántico 655 con el anticuerpo de poliacrilamida-hidrácida biotinilado.

La FIG. 7 ilustra una divulgación de un protocolo de tinción para la detección IHQ QDot.

La FIG. 8 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 20X) usando un conjugado antinitropirazol-punto cuántico 655 con un conjugado anti-lambda-poliacrilamida-hidrácida-nitropirazol.

La FIG. 9 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2;

aumento de 20X) usando un conjugado antibenzofurazano-punto cuántico 585 con un conjugado anti-lambda-poliacrilamida-hidracida-benzofurazano.

5 La FIG. 10 es una fotografía que ilustra la tinción de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 20X) usando un conjugado antidinitrofenilo-punto cuántico 605 con un conjugado anti-lambda-poliacrilamida-hidracida-dinitrofenilo.

10 La FIG. 11 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 20X) usando un conjugado antitiazolsulfonamida-punto cuántico 565 con un conjugado anti-lambda-poliacrilamida-hidracida-tiazolsulfonamida.

La FIG. 12 ilustra una divulgación de un protocolo de tinción para la detección de AP-ISH del VPH.

15 La FIG. 13 ilustra una divulgación de un protocolo de tinción para la detección de SISH del VPH.

La FIG. 14 es una fotografía que ilustra la tinción de VPH en tejido xenografiado por detección de plata (aumento de 40X) usando un anticuerpo anti-IgG de conejo caprino biotinilado específico de Fc en células CaSki (400-600 copias).

20 La FIG. 15 es una fotografía que ilustra la tinción de VPH en tejido xenografiado por detección de plata (aumento de 40X) usando un anticuerpo anti-IgG de conejo caprino biotinilado específico de Fc en células HeLa (10-50 copias).

La FIG. 16 es una fotografía que ilustra la tinción de VPH en anticuerpo anti-IgG de conejo caprino biotinilado de tejido xenografiado (aumento de 40X) en células SiHa (1-2 copias), anticuerpo biotinilado específico de Fc.

25 La FIG. 17 es una fotografía que ilustra la tinción de VPH en tejido xenografiado por detección de plata (aumento de 40X) usando un anticuerpo anti-IgG de conejo caprino biotinilado específico de Fc en células C33 (0 copias, control negativo).

30 La FIG. 18 es una fotografía que ilustra la tinción de VPH en tejido xenografiado por detección de plata (aumento de 40X) usando un anticuerpo anti-IgG de conejo caprino biotinilado de poliacrilamida-hidracida en células CaSki (400-600 copias).

35 La FIG. 19 es una fotografía que ilustra la tinción de VPH en tejido xenografiado por detección de plata (aumento de 40X) usando un anticuerpo anti-IgG de conejo caprino biotinilado de poliacrilamida-hidracida en células HeLa (10-50 copias).

40 La FIG. 20 es una fotografía que ilustra la tinción de VPH en tejido xenografiado por detección de plata (aumento de 40X) usando un anticuerpo anti-IgG de conejo caprino biotinilado de poliacrilamida-hidracida en células SiHa (1-2 copias).

La FIG. 21 es una fotografía que ilustra la tinción de VPH en tejido xenografiado por detección de plata (aumento de 40X) usando un anticuerpo anti-IgG de conejo caprino biotinilado de poliacrilamida-hidracida en células C33 (0 copias, control negativo).

45 La FIG. 22 ilustra una divulgación de un protocolo de tinción para la detección IHQ múltiple con puntos cuánticos.

La FIG. 23 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 40X) usando un conjugado antinitropirazol-punto cuántico 655 con un conjugado anti-CD34-poliacrilamida-hidracida-nitropirazol.

50 La FIG. 24 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 40X) usando un conjugado antibenzofurazano-punto cuántico 585 con un conjugado anti-Ki67-poliacrilamida-hidracida-benzofurazano.

55 La FIG. 25 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 40X) usando un conjugado dinitrofenilo-punto cuántico 605 con un conjugado anti-kappa-poliacrilamida-hidracida-dinitrofenilo.

60 La FIG. 26 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 40X) usando un conjugado antitiazolsulfonamida-punto cuántico 565 con un conjugado anti-CD45-poliacrilamida-hidracida-tiazolsulfonamida.

65 La FIG. 27 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (Olympus DP71; UPlanSApo; aumento de 40X) usando un conjugado antidinitrofenilo-HRP/DAB con un conjugado anti-kappa-polivinilpirrolidona-hidracida-dinitrofenilo.

La FIG. 28 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 40X) usando un conjugado antidinitrofenilo-punto cuántico 655 con un conjugado anti-kappa-poliivinilpirrolidona-hidracida-dinitrofenilo.

5 La FIG. 29 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (Olympus DP71; UPlanSApo; aumento de 40X) usando un conjugado antidinitrofenilo-HRP/DAB con un conjugado anti-kappa-poli(isobutileno-co-maleico)-hidracida-dinitrofenilo.

10 La FIG. 30 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 40X) usando un conjugado antidinitrofenilo-punto cuántico 655 con un conjugado anti-kappa-poli(isobutileno-co-maleico)-hidracida-dinitrofenilo.

15 La FIG. 31 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (Olympus DP71; UPlanSApo; aumento de 40X) usando un conjugado antidinitrofenilo-HRP/DAB con un conjugado anti-kappa-poli(ácido acrílico)-hidracida-dinitrofenilo.

20 La FIG. 32 es una fotografía que ilustra la tinción de tejido de amígdala (filtro de paso largo, Omega Optical XFO5-2; aumento de 40X) usando un conjugado antidinitrofenilo-punto cuántico 655 con un conjugado anti-kappa-poli(ácido acrílico)-hidracida-dinitrofenilo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Abreviaturas

25 **Ab** - anticuerpo

(Ab - AP) - conjugado anticuerpo-fosfatasa alcalina

30 **ABS** - solución salina tamponada con acetato.

AP - fosfatasa alcalina

BSA - seroalbúmina bovina

35 **CMV** - citomegalovirus

dPEG - polietilenglicol discreto, tal como dPEG₄, que se refiere a un compuesto de PEG dimensionado de forma discreta que tiene 4 átomos de oxígeno de éter.

40 **EBER** - ARN codificado por el virus de Epstein-Barr

DL - marcador detectable

45 **Fc** - fragmento cristizable

HRP - peroxidasa de rábano picante

IHQ - inmunohistoquímica

50 **ISH** - hibridación *in situ*

MAL - maleimida

55 **MBCH** - ácido mercaptobutírico-carbohidracida

MBH - ácido mercaptobutírico-hidracida

NHS - *N*-hidroxisuccinimida

60 **SBM** - molécula de unión específica

SEC - cromatografía de exclusión por tamaño

65 **SISH** - hibridación *in situ* con plata

II. Términos

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

Como se usa en el presente documento, los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Además, como se usa en el presente documento, el término "comprende" quiere decir "incluye". Por tanto, "que comprende A o B" quiere decir que incluye A, B, o A y B. Se debe entender además que todos los tamaños de aminoácidos y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para polipéptidos u otros compuestos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en las pruebas de la presente divulgación, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Para facilitar la revisión de los diversos aspectos de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Amplificación: determinados aspectos de la presente divulgación permiten que se detecte una única diana usando varios complejos de visualización, donde los complejos pueden ser iguales o diferentes, para facilitar la identificación y/o cuantificación de una diana particular.

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

Animal: organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma similar, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como animales, por ejemplo, humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos y vacas.

Anticuerpo: "anticuerpo" se refiere conjuntamente a inmunoglobulinas o moléculas similares a inmunoglobulinas (incluyendo a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como humanos, cabras, conejos y ratones), así como especies no mamíferas, tales como inmunoglobulinas de tiburón. "Anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés altamente similares) para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que tienen una constante de unión para la molécula de interés que es de al menos 10^3 M^{-1} mayor, al menos 10^4 M^{-1} mayor o al menos 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra biológica).

Más en particular, "anticuerpo" se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una ligera, de las que cada una tiene una región variable, denominada la región pesada variable (V_H) y la región ligera variable (V_L). En conjunto, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión del antígeno reconocido por el anticuerpo.

Esto incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de ellas bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de anticuerpos proteolíticos [tales como fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab' , fragmentos Fab' -SH y fragmentos Fab como son conocidos en la técnica], fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos $F(ab')_2$, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), diacuerpos y triacuerpos (como son conocidos en la técnica) y anticuerpos camélidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.015.695; 6.005.079-5.874.541; 5.840.526; 5.800.988; y 5.759.808). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina se unen por un conector, mientras que en dsFv, las cadenas

se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas genomanipuladas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., *Immunology*, 3.^a Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997.

Típicamente, una inmunoglobulina natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadenas pesadas que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también son conocidas como "dominios"). En combinación, las regiones variables de la cadena pesada y la ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "estructural" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Se ha definido la extensión de la región estructural y de las CDR (véase, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos de Kabat ahora se encuentra actualizada en línea. Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas en una especie. La región estructural de un anticuerpo, es decir, las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligera y pesada constitutivas, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se localiza la CDR particular. Por tanto, una CDR3 de V_H se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo que se une a RET tendrá una región V_H específica y la secuencia de la región V_L , y por tanto secuencias CDR específicas. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de anticuerpo a anticuerpo, solo se implica directamente un número limitado de posiciones aminoacídicas en las CDR en la unión a antígeno. Estas posiciones en las CDR se llaman residuos determinantes de la especificidad (SDR).

Antígeno: un compuesto, composición o sustancia que puede estar específicamente unida por los productos de inmunidad humoral o celular específica, tales como una molécula de anticuerpo o un receptor de linfocitos T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, glúcidos (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos y proteínas. Las categorías comunes de antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y otros parásitos, antígenos tumorales, antígenos implicados en enfermedades autoinmunitarias, alergia y rechazo de injertos, toxinas y otros antígenos diversos. En un ejemplo, un antígeno es un antígeno de *Bacillus*, tal como γ PGA.

Avidina: cualquier tipo de proteína que se une específicamente a biotina para la exclusión sustancial de otras moléculas pequeñas que podrían estar presentes en una muestra biológica. Los ejemplos de avidina incluyen avidinas que están presentes de forma natural en la clara de huevo, proteína de semillas oleaginosas (por ejemplo, harina de soja) y grano (por ejemplo, maíz) y estreptavidina, que es una proteína de origen bacteriano.

Afinidad de unión: la tendencia de una molécula a unirse (típicamente de forma no covalente) con otra molécula, tal como la tendencia de un miembro de un par de unión específica por otro miembro de un par de unión específica. Una afinidad de unión se puede medir como una constante de unión, con una afinidad de unión por un par de unión específica (tal como un par anticuerpo/antígeno) que puede ser de al menos $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, tal como al menos $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ o al menos $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. En un aspecto de la presente divulgación, la afinidad de unión se calcula por una modificación del procedimiento de Scatchard descrito por Frankel *et al.*, *Mol. Immunol.*, 16:101-106, 1979. En otro aspecto de la presente divulgación, la afinidad de unión se mide por una tasa de disociación antígeno/anticuerpo. Aún en otro aspecto de la presente divulgación, una afinidad de unión alta se mide por un radioinmunoensayo de competición. En varios aspectos de la presente divulgación, una afinidad de unión alta por un par anticuerpo/antígeno es de al menos aproximadamente $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. En otros aspectos de la presente divulgación, una afinidad de unión alta es de al menos aproximadamente $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente $2,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente $2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente $3,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente $3,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente $4,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos aproximadamente $4,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, o al menos aproximadamente $5,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Transportador: una molécula a la que se puede unir un hapteno o un antígeno. Las moléculas transportadoras incluyen transportadores inmunógenos y transportadores de unión específica. Cuando se une a un transportador inmunógeno, la molécula unida se puede volver inmunógena. Se pueden elegir transportadores inmunógenos para incrementar la inmunogenicidad de la molécula unida y/o para provocar anticuerpos contra el transportador, que son

diagnóstica, analítica y/o terapéuticamente beneficiosos. La unión covalente de una molécula a un transportador puede conferir una potenciación de la inmunogenicidad y la dependencia de linfocitos T (Pozsgay *et al.*, *PNAS* 96:5194-97, 1999; Lee *et al.*, *J. Immunol.* 116:1711-18, 1976; Dintzis *et al.*, *PNAS* 73:3671-75, 1976). Los transportadores útiles incluyen transportadores poliméricos, que pueden ser materiales naturales (por ejemplo, proteínas de bacterias o virus), semisintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales a los que se puede unir un resto reactivo. Los transportadores de unión específica pueden ser por cualquier tipo de resto de unión específica, incluyendo un anticuerpo, una avidina, etc.

Anticuerpo quimérico: un anticuerpo que tiene residuos estructurales de una especie, tal como humano, y CDR (que en general confieren unión a antígeno) de otra especie, tal como un anticuerpo murino que se une específicamente a RET.

Conjugado: un "conjugado" se refiere a dos o más moléculas (y/o materiales tales como nanopartículas) que se unen covalentemente en una construcción más grande. En algunos aspectos de la presente divulgación, un conjugado incluye una o más biomoléculas (tales como péptidos, proteínas, enzimas, glúcidos, polisacáridos, lípidos, glucoproteínas y lipoproteínas) unidas covalentemente a una o más de otras moléculas, tales como una o más de otras biomoléculas. En otros aspectos de la presente divulgación, un conjugado incluye una o más moléculas de unión específica (tales como anticuerpos) unidas covalentemente a uno o más marcadores detectables (tales como un fluoróforo, un luminóforo, nanopartículas fluorescentes, haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos).

Conjugar, acoplar, fijar, unir o enlazar: unir covalentemente una molécula a otra molécula para formar una molécula más grande. Por ejemplo, preparar con dos polipéptidos una molécula polipeptídica contigua, o unir covalentemente un hapteno u otra molécula a un polipéptido, tal como un anticuerpo scFv. En el contexto específico, los términos incluyen referencia a fijar un ligando, tal como un resto de anticuerpo, a una molécula efectora ("EM"). El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes.

Acoplar una molécula de unión específica a un marcador detectable a través de grupos funcionales hidracida reactivos: se refiere a unir covalentemente una molécula de unión específica a otra molécula por un enlace covalente directo a un átomo de nitrógeno de un grupo funcional hidracida.

Marcador detectable: una molécula o material que puede producir una señal detectable (tal como visualmente, electrónicamente o de otro modo) que indica la presencia y/o concentración del marcador en una muestra. Cuando se conjuga con una molécula de unión específica, se puede usar el marcador detectable para localizar y/o cuantificar la diana a la que se dirige la molécula de unión específica. De este modo, se puede detectar la presencia y/o concentración de la diana en una muestra detectando la señal producida por el marcador detectable. Un marcador detectable se puede detectar directa o indirectamente, y se pueden usar varios marcadores detectables diferentes conjugados con moléculas de unión específica diferentes en combinación para detectar una o más dianas. Por ejemplo, un primer marcador detectable, tal como un hapteno conjugado con un anticuerpo específico para una diana, se puede detectar indirectamente a través del uso de un segundo marcador detectable que se conjuga con una molécula que se une específicamente al primer marcador detectable. Se pueden conjugar múltiples marcadores detectables que se pueden detectar por separado con diferentes moléculas de unión específica que se unen específicamente a diferentes dianas para proporcionar un ensayo multiplexado que puede proporcionar detección simultánea de las múltiples dianas en una muestra. Una señal detectable se puede generar por cualquier mecanismo conocido o aún por descubrir, incluyendo la absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (incluyendo fotones de radiofrecuencia, frecuencia de microondas, frecuencia infrarroja, frecuencia visible y frecuencia ultravioleta). Los marcadores detectables incluyen materiales y moléculas con color, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (tal como convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o incrementando la turbidez de la muestra), haptenos que se pueden detectar a través de interacciones de unión anticuerpo-hapteno usando conjugados de anticuerpos marcados de forma detectable adicionales, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Los ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β -galactosidasa o β -glucuronidasa; fluoróforos tales como fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, tintes BODIPY, resorufinas y rodaminas (muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes se pueden encontrar en *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Molecular Probes, Eugene, OR); nanopartículas tales como puntos cuánticos (obtenidos, por ejemplo, de QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Hayward, CA; véanse también las patentes de EE. UU. n.º 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138); quelatos metálicos, tales como los quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o paramagnéticos como Gd^{3+} ; y liposomas, por ejemplo, liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas. Cuando el marcador detectable incluye una enzima, se puede usar un sustrato detectable tal como un cromógeno, un compuesto fluorógeno o un compuesto luminógeno en combinación con la enzima para generar una señal detectable (una amplia variedad de dichos compuestos está disponibles comercialmente, por ejemplo, de Invitrogen Corporation, Eugene OR). Los ejemplos particulares de compuestos cromógenos incluyen diaminobencidina (DAB), fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP), Fast Red, fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), nitroazul de tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, Fast Red, AP Orange, AP Blue, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido

(X-Gal), metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (MU-Gal), *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronida (X-Gluc), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio. De forma alternativa, se puede usar una enzima en un esquema de detección metalográfica. Los procedimientos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, en combinación con un ion metálico soluble en agua y un sustrato inactivo de oxidorreducción de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo de oxidorreducción por la enzima, y el agente activo de oxidorreducción reduce el ion metálico, provocando que forme un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. pendiente de trámite n.º 11/015.646, presentada el 20 de diciembre de 2004, publicación PCT n.º 2005/003777 y publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0265922). Los procedimientos de detección metalográfica también incluyen el uso de una enzima oxidoreductasa (tal como la peroxidasa de rábano picante) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, de nuevo para formar un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.670.113). Los haptenos son moléculas pequeñas que se unen específicamente por anticuerpos, aunque por sí mismas no provocarán una respuesta inmunitaria en un animal y primero se deben unir a una molécula transportadora más grande tal como una proteína para generar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de haptenos incluyen dinitrofenilo, biotina, digoxigenina y fluoresceína. Se divulgan ejemplos adicionales de haptenos oxazol, pirazol, tiazol, nitroarilo, benzofurano, triperpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y ciclolignano en la solicitud de patente provisional de EE. UU. pendiente de trámite n.º 60/856133, presentada el 1 de noviembre de 2006.

Epítipo: un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias peptídicas contiguas o no contiguas en una molécula que son antigénicas, es decir, que provocan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico particular.

Conjugado específico de Fc: un conjugado de una inmunoglobulina (o fragmento de la misma) en el que una segunda molécula (tal como un marcador detectable) se une covalentemente a la porción glucosilada de la inmunoglobulina (o un fragmento de una inmunoglobulina que retiene la porción glucosilada). La porción glucosilada de una inmunoglobulina se encuentra en la región Fc, que es una región de una inmunoglobulina que se localiza en las cadenas pesadas de la inmunoglobulina en posiciones fuera de la porción de la inmunoglobulina que es responsable de la actividad de unión específica de la inmunoglobulina.

Hapteno: una molécula, típicamente una molécula pequeña, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero típicamente no puede ser sustancialmente inmunógena, excepto en combinación con una molécula transportadora.

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

Anticuerpo humanizado: un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y de cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. La estructura aceptora de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados de la estructura donante. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones aminoácidas conservadoras adicionales que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Se pueden construir inmunoglobulinas humanizadas por medio de genomanipulación (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.585.089).

Inmunoglobulina humanizada: una inmunoglobulina que incluye una región estructural humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la estructura se denomina "aceptora". En un aspecto de la presente divulgación, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, idénticas en al menos aproximadamente un 85-90 %, tal como aproximadamente un 95 % o más. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las correspondientes partes de las secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales.

Hidracida o grupo hidracida: un grupo hidracida ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$); un grupo carbohidracida ($-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$); un grupo semicarbacida ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$); un grupo tiosemicarbacida ($-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}-\text{NH}_2$); un grupo tiocarbacida ($-\text{NH}-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}-\text{NH}_2$); un grupo ácido carbónico-dihidracina ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$) o un derivado que contiene azufre del mismo; o un grupo hidracina-carboxilato ($-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$) o un derivado que contiene azufre del mismo.

Grupo reactivo de hidracida: un grupo de átomos que puede reaccionar con y formar un enlace covalente con un grupo hidracida. Los grupos aldehído y cetona son ejemplos de grupos reactivos de hidracida. Los grupos reactivos de hidracida pueden ser una parte intrínseca de una molécula o se pueden introducir en una molécula. Un procedimiento para introducir un grupo aldehído (un grupo reactivo de hidracida) en polisacáridos y glucoproteínas

(incluyendo anticuerpos) es por oxidación tal como oxidación mediada por peryodato de dioles vecinales. Además, los dobles enlaces en ácidos grasos insaturados y ceramidas se pueden convertir en dioles por tetróxido de osmio y a continuación oxidarse por peryodato a aldehídos. Además, los residuos de serina y treonina N-terminales de péptidos y proteínas se pueden oxidar selectivamente por peryodato a grupos aldehído, permitiendo la modificación selectiva de determinadas proteínas tales como corticotrofina y β -lactamasa. La modificación de anticuerpos oxidados con peryodato no inactiva típicamente el anticuerpo. La variación de la concentración de peryodato de sodio durante la reacción de oxidación da cierta especificidad con respecto a los tipos de residuos glucídicos que se modifican. Por ejemplo, el peryodato de sodio a una concentración de 1 mM a 0 °C típicamente escinde solo en los hidroxilos adyacentes entre los átomos de carbono 7, 8 y 9 de los residuos de ácido siálico. La oxidación de polisacáridos que usan concentraciones 10 mM o mayores de peryodato de sodio da como resultado la oxidación de residuos glucídicos distintos de ácido siálico, creando de este modo muchos aldehídos en un polisacárido dado. Un protocolo general adecuado se describe por Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8. Otro procedimiento para introducir aldehídos en biomoléculas es a través del uso de glucosa oxidasas específicas, por ejemplo, galactosa oxidasa, que es una enzima que oxida los residuos de galactosa terminales a aldehídos, en particular en glucoproteínas. Cuando los residuos de galactosa son penúltimos a los residuos de ácido siálico, se puede usar neuramidasa para retirar el residuo de ácido siálico y exponer la galactosa como el residuo terminal. Se proporciona un protocolo para usar una combinación de neuramidasa y galactosa oxidasa para oxidar residuos de galactosa para proporcionar un grupo aldehído reactivo en Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8. Los aldehídos también se pueden introducir en una molécula haciendo reaccionar un grupo amina de una molécula con un NHS-aldehído tal como *p*-formilbenzoato de succinimidilo (SFB) o *p*-formilfenoxiacetato de succinimidilo (SFPA) (Invitrogen Corp., Eugene, OR). De forma alternativa, se pueden usar compuestos de bis-aldehído tales como glutaraldehído para modificar un grupo amina para proporcionar un grupo aldehído. De nuevo, se proporcionan protocolos adecuados en Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8.

Hidracina, derivados de hidracina: compuestos químicos o restos que tienen típicamente una fórmula N_2H_4 . Los derivados de hidracina son compuestos o restos donde al menos uno, y potencialmente varios átomos de hidrógeno de hidracina se reemplazan con otros grupos, tales como grupos alifáticos, en particular grupos alquilo, e incluso más típicamente grupos alquilo inferiores.

Respuesta inmunitaria: una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, linfocito T, macrófago o polimorfonucleocito, a un estímulo. Una respuesta inmunitaria puede incluir cualquier célula del cuerpo implicada en una respuesta de defensa del huésped, por ejemplo, una célula epitelial que secreta interferón o una citocina. Una respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a, una respuesta inmunitaria innata o inflamación.

Conjugado o composición inmunogénica: un término usado en el presente documento para querer decir una composición útil para estimular o provocar una respuesta inmunitaria específica (o respuesta inmunogénica) en un vertebrado. En algunos aspectos de la presente divulgación, la respuesta inmunogénica es protectora o proporciona inmunidad protectora, ya que permite al animal vertebrado resistir mejor la progresión de la infección o enfermedad del organismo contra el que se dirige la composición inmunogénica. Un ejemplo específico de un tipo de composición inmunogénica es una vacuna.

Inmunógeno: un compuesto, composición o sustancia que puede, en condiciones apropiadas, estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal.

Dosis inmunológicamente eficaz: una dosis inmunológicamente eficaz de los conjugados divulgados de la divulgación es terapéuticamente eficaz y prevendrá, tratará, disminuirá o atenuará la gravedad, extensión o duración de una enfermedad o afección.

Condiciones inmunológicamente reactivas: incluye referencia a condiciones que permiten que un anticuerpo producido frente a un epítipo particular se una a ese epítipo en un grado detectablemente mayor que, y/o hasta la exclusión sustancial de, la unión a sustancialmente todos los otros epítopos. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión al anticuerpo y típicamente son las utilizadas en protocolos de inmunoensayo o las condiciones encontradas *in vivo*. Véase Harlow y Lane, *supra*, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo. Las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los procedimientos son "condiciones fisiológicas" que incluyen referencia a condiciones (tales como temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas dentro de un mamífero o célula de mamífero vivo. Aunque se reconoce que algunos órganos se someten a condiciones extremas, el entorno intraorgánico e intracelular normalmente se encuentra alrededor de pH 7 (es decir, de pH 6,0 a pH 8,0, más típicamente de pH 6,5 a 7,5), contiene agua como disolvente predominante, y existe a una temperatura superior a 0 °C e inferior a 50 °C. La osmolaridad está dentro del intervalo que mantiene la viabilidad y proliferación celular.

Aislado: un microorganismo "aislado" (tal como un virus, bacteria, hongo o protozoo) se ha separado o purificado sustancialmente a partir de microorganismos de diferentes tipos, cepas o especies. Se pueden aislar microorganismos por una variedad de técnicas, incluyendo dilución en serie y cultivo.

Un componente biológico "aislado" (tal como una proteína u orgánulo) se ha separado o purificado sustancialmente a partir de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce el componente de forma natural, tales como otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y orgánulos. Las proteínas que se han "aislado" incluyen proteínas purificadas por procedimientos de purificación estándar. El término también abarca proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula huésped, así como proteínas sintetizadas químicamente, o fragmentos de las mismas.

Ki-67: un antígeno nuclear (proteína) implicado en la proliferación celular útil para el diagnóstico de cáncer, ya que se expresa en todas las etapas del ciclo celular, excepto para G0 (la fase de reposo).

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

Mamífero: este término incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma similar, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como animales.

Molécula de interés o diana: una molécula para la que se va a determinar la presencia, localización y/o concentración. Los ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas marcadas con haptenos.

Anticuerpo monoclonal: un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de las cadenas ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, preparando células formadoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células de bazo inmunitarias. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Múltiple, multiplexado, multiplexación: los aspectos de la presente divulgación permiten que se detecten múltiples dianas en una muestra de forma sustancialmente simultánea, o secuencial, como se desee, usando varios diferentes conjugados. La multiplexación puede incluir la identificación y/o cuantificación de péptidos, proteínas, tanto individualmente como en cualquiera y todas las combinaciones. La multiplexación también puede incluir la detección de dos o más de un mensajero y una proteína en una célula en su contexto anatómico.

Nanopartícula: una partícula a nanoescala con un tamaño que se mide en nanómetros, por ejemplo, una partícula nanoscópica que tiene al menos una dimensión de menos de aproximadamente 100 nm. Los ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas metálicas, materiales de tipo fullereno, nanotubos inorgánicos, dendrímeros (tales como con quelatos metálicos unidos de forma covalente), nanofibras, nanocuernos, nanocebollas, nanobarras, nanocuerdas y puntos cuánticos. Una nanopartícula puede producir una señal detectable, por ejemplo, a través de la absorción y/o emisión de fotones (incluyendo fotones de radiofrecuencia y visibles) y resonancia de plasmones.

Neoplasia y tumor: el proceso de crecimiento anómalo e incontrolado de las células. La neoplasia es un ejemplo de un trastorno proliferativo.

El producto de la neoplasia es una neoplasia (un tumor), que es un crecimiento anómalo de tejido que resulta de una división celular excesiva. Un tumor que no metastatiza se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o que puede metastatizar se denomina "maligno". Los ejemplos de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano (formas de escasa y de gran malignidad), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de las cadenas pesadas, síndrome mielodisplásico, tricoleucemia y mielodisplasia.

Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteógeno y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, liomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfocítica, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular tiroideo, carcinoma papilar tiroideo, feocromocitomas carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma del acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

No tiolado: conjugados que no incluyen un átomo de azufre entre la cadena principal polimérica de un transportador y la molécula de unión específica.

Ácido peptidonucleico: los ácidos peptidonucleicos son miméticos de ácidos nucleicos que comprenden una cadena principal pseudopeptídica. Los oligómeros ácidos peptidonucleicos forman estructuras dobles estables con oligómeros complementarios de ADN, ARN (o ANP) y también se pueden unir a dianas en el ADN doble por invasión de hélice. La historia, propiedades y aplicaciones de los ácidos peptidonucleicos en el descubrimiento de fármacos y la detección de ADN se presentan en el libro "Peptide Nucleic Acids". Los ácidos peptidonucleicos se diseñaron originalmente como ligandos para reconocer el ADN bicatenario. Las nucleobases del ADN se retuvieron, pero la cadena principal de desoxirribosa fosfodiéster del ADN se reemplazó por una cadena principal pseudopeptídica. Los ácidos peptidonucleicos ejemplares incluyen ácidos peptidonucleicos de homotimina.

Polipéptido: un polímero en el que los monómeros son residuos aminoácidos que se fijan conjuntamente a través de enlaces amida. Cuando los aminoácidos son aminoácidos α , se puede usar el isómero óptico L o bien el isómero óptico D. Los términos "polipéptido" o "proteína" como se usa en el presente documento pretenden englobar cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glucoproteínas. El término "polipéptido" pretende cubrir específicamente proteínas naturales así como las que se producen de forma recombinante o sintética.

El término "residuo" o "residuo aminoácido" incluye referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido.

Proteína: una molécula, en particular un polipéptido, compuesto de aminoácidos.

Purificado: el término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, se destina a un término relativo. Por tanto, por ejemplo, un péptido, proteína, conjugado u otro compuesto activo purificado es uno que está aislado todo o en parte de proteínas u otros contaminantes. En general, los péptidos, proteínas, conjugados u otros compuestos activos sustancialmente purificados para su uso en la divulgación comprenden más de un 80 % de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación antes de la mezcla o formulación del péptido, proteína, conjugado u otro compuesto activo con un vehículo, excipiente, tampón, agente potenciador de la absorción, estabilizante, conservante, coadyuvante u otro coingrediente farmacéutico en una formulación farmacéutica completa para administración terapéutica. Más típicamente, el péptido, proteína, conjugado u otro compuesto activo se purifica para representar más de un 90 %, a menudo más de un 95 % de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación purificada antes de la mezcla con otros ingredientes de formulación. En otros casos, la preparación purificada puede ser esencialmente homogénea, en la que otras especies macromoleculares no son detectables por técnicas convencionales.

Punto cuántico: una partícula a nanoescala que presenta propiedades electrónicas y ópticas dependientes del tamaño debido al confinamiento cuántico. Los puntos cuánticos se han construido, por ejemplo, a partir de materiales semiconductores (por ejemplo, seleniuro de cadmio y sulfuro de plomo) y de cristallitos (cultivados por medio de epitaxia de haz molecular), etc. Una variedad de puntos cuánticos que tienen características diversas de fluorescencia y química de superficie están disponibles comercialmente de Invitrogen Corporation, Eugene, OR (véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138). Los puntos cuánticos también están disponibles comercialmente de Evident Technologies (Troy, NY). Otros puntos cuánticos incluyen puntos cuánticos de aleación tales como los puntos cuánticos ZnSSe, ZnSeTe, ZnSTe, CdSSe, CdSeTe, ScSTe, HgSSe, HgSeTe, HgSTe, ZnCdS, ZnCdSe, ZnCdTe, ZnHgS, ZnHgSe, ZnHgTe, CdHgS, CdHgSe, CdHgTe, ZnCdSSe, ZnHgSSe, ZnCdSeTe, ZnHgSeTe, CdHgSSe, CdHgSeTe, InGaAs, GaAlAs e InGaN (los puntos cuánticos de aleación y los procedimientos para fabricar los mismos se divulgan, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 2005/0012182 y la publicación PCT WO 2005/001889).

Grupos reactivos: las fórmulas en toda esta solicitud se refieren a "grupos reactivos", que pueden ser cualquiera de una variedad de grupos adecuados para acoplar una primera unidad a una segunda unidad como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el grupo reactivo podría ser un grupo reactivo de amina, tal como un isotiocianato, un isocianato, una acida de acilo, un éster de NHS, un cloruro de ácido, tal como cloruro de sulfonilo, aldehídos y glioxales, epóxidos y oxiranos, carbonatos, agentes de arilación, imidoésteres, carbodiimidas, anhídridos y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales reactivos de tiol adecuados incluyen haluros de haloacetilo y de alquilo, maleimidas, aciridinas, derivados de acrilolilo, agentes de arilación, reactivos de intercambio tiol-disulfuro, tales como disulfuros de piridilo, TNB-tiol y reductores de disulfuro, y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales reactivos de carboxilato adecuados incluyen diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, compuestos de carbonildiimidazol y carbodiimidas. Los grupos funcionales reactivos de hidroxilo adecuados incluyen epóxidos y oxiranos, carbonildiimidazol, *N,N*-disuccinimidilcarbonatos o *N*-hidroxisuccinimidilcloroformatos, compuestos oxidantes de peryodato, oxidación enzimática, alquilhalógenos e isocianatos. Los grupos funcionales reactivos de aldehído y cetona incluyen hidracinas, bases de Schiff, productos de aminación reductora, productos de condensación de Mannich y combinaciones de los mismos. Los compuestos reactivos de hidrógeno activo incluyen derivados de diazonio, productos de condensación de Mannich, productos de reacción de yodación y combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales químicos fotoreactivos incluyen arilacidas, arilacidas halogenadas, benzofenonas,

compuestos diazoicos, derivados de diacirina y combinaciones de los mismos.

Muestra: el término "muestra" se refiere a cualquier sustancia (o material) líquida, semisólida o sólida en o sobre la que puede estar presente una diana. En particular, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra obtenida de un material biológico. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen muestras de tejido y muestras de citología, incluyendo los ejemplos más particulares sangre periférica, orina, saliva, biopsia de tejido, espécimen quirúrgico, muestras de amniocentesis y material de autopsia.

Cromógeno A-SISH: una solución de acetato de plata.

Cromógeno B-SISH: una solución de hidroquinona.

Cromógeno C-SISH: una solución de peróxido de hidrógeno.

Resto de unión específica: un miembro de un par de unión específica. Los pares de unión específica son pares de moléculas que se caracterizan por que se unen entre sí hasta la exclusión sustancial de unión a otras moléculas (por ejemplo, los pares de unión específica pueden tener una constante de unión que es al menos 10^3 M^{-1} mayor, 10^4 M^{-1} mayor o 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión para cualquiera de los dos miembros del par de unión con otras moléculas en una muestra biológica). Los ejemplos particulares de restos de unión específica incluyen proteínas de unión específica (por ejemplo, anticuerpos, lectinas, avidinas tales como estreptavidinas y proteína A). Los restos de unión específica también pueden incluir las moléculas (o porciones de las mismas) que están unidas específicamente por dichas proteínas de unión específica.

Diana: cualquier molécula para la que se determina o se puede determinar su presencia, localización y/o concentración. Los ejemplos de moléculas diana incluyen proteínas y haptenos, tales como haptenos unidos covalentemente a proteínas. Las moléculas diana se detectan típicamente usando uno o más conjugados de una molécula de unión específica y un marcador detectable.

Cantidad terapéuticamente eficaz: una cantidad de un agente específico suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que se está tratando con ese agente. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad de un conjugado útil para incrementar la resistencia a, prevenir, mejorar y/o tratar una infección y enfermedad. Idealmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente es una cantidad suficiente para incrementar la resistencia para, prevenir, mejorar y/o tratar una infección y sin provocar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. La cantidad eficaz de un agente útil para incrementar la resistencia a, prevenir, mejorar y/o tratar una infección y enfermedad en un sujeto dependerá del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección y la forma de administración de la composición terapéutica.

Vacuna: una vacuna es una composición farmacéutica que provoca una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica en un sujeto. En algunos casos, la respuesta inmunitaria es una respuesta protectora. Típicamente, una vacuna provoca una respuesta inmunitaria específica de antígeno a un antígeno de un patógeno, por ejemplo, un patógeno bacteriano o vírico, o a un elemento constitutivo celular correlacionado con una afección patológica. Una vacuna puede incluir un polinucleótido, un péptido o polipéptido, un polisacárido, un virus, una bacteria, una célula o uno o más elementos constitutivos celulares. En algunos casos, el virus, bacteria o célula se puede inactivar o atenuar para prevenir o reducir la probabilidad de infección, mientras que se mantiene la inmunogenicidad del elemento constitutivo de la vacuna.

III. Introducción

Determinados aspectos divulgados de la presente divulgación se refieren a un procedimiento para formar un conjugado de dos o más moléculas, y conjugados preparados por el procedimiento. Un experto en la técnica reconocerá que el procedimiento divulgado es útil para formar cualquier combinación de moléculas que tienen grupos funcionales que pueden reaccionar con un grupo funcional reactivo en un transportador polimérico, tal como un grupo funcional hidracida. Los conjugados específicos divulgados para ejemplificar la divulgación no se deben interpretar como limitantes del alcance de la divulgación. Por ejemplo, aunque algunos de los conjugados divulgados son conjugados transportador de hapteno polimérico-anticuerpo, los conjugados entre otras biomoléculas y otros marcadores detectables (tales como haptenos, fluoróforos, luminóforos, marcadores fluorescentes, nanopartículas fluorescentes y proteínas fluorescentes, tales como proteína fluorescente verde) también están dentro del alcance de la divulgación, los conjugados entre otras biomoléculas y otros marcadores detectables (tales como haptenos, fluoróforos, luminóforos, marcadores fluorescentes, nanopartículas fluorescentes y proteínas fluorescentes, tales como proteína fluorescente verde) también están dentro del alcance de la divulgación.

Un aspecto del procedimiento divulgado incluye hacer reaccionar un polímero que tiene varios grupos funcionales reactivos (transportador polimérico), tales como varios grupos hidracida reactivos, o combinaciones de varios grupos funcionales diferentes, teniendo una primera molécula (tal como un anticuerpo) un grupo que puede reaccionar con el grupo funcional reactivo proporcionado por el transportador polimérico. Por ejemplo, si el grupo funcional reactivo es una hidracida, entonces el grupo funcional puede ser un grupo funcional carbonilo, tal como un aldehído. La primera

molécula incluye al menos un grupo funcional reactivo restante proporcionado por el transportador polimérico que a continuación puede reaccionar con una segunda molécula, tal como un hapteno directamente, un hapteno con un conector, o ambos. De forma alternativa, se podría formar un conjugado que comprende un transportador polimérico y un hapteno y/o conector-hapteno, que a continuación se hace reaccionar con la segunda molécula. En este ejemplo, la segunda molécula podría ser un anticuerpo. Aún como otra alternativa, se pueden acoplar varios transportadores poliméricos diferentes, tales como transportadores para haptenos, a una segunda molécula, tal como un anticuerpo. En aspectos particulares de la presente divulgación, el transportador polimérico es una hidracida poliacrílica que se acopla a un anticuerpo, preferentemente solo en la región Fc del anticuerpo, y varios haptenos y/o compuestos hapteno-conector, tales como PEG-biotina, PEG-DNP, fluoresceína, etc., se acoplan al transportador de hapteno polimérico.

Otro aspecto divulgado es un kit que incluye un conector divulgado e instrucciones para realizar el procedimiento divulgado para preparar un conjugado. También se divulgan procedimientos para usar conjugados divulgados para detectar una diana en una muestra.

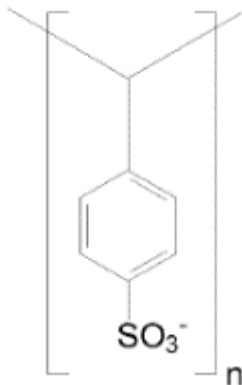
IV. Transportadores poliméricos

Los aspectos de la divulgación se refieren al uso de materiales poliméricos como transportadores, tales como transportadores de hapteno. Los materiales poliméricos considerados en general más útiles para la presente divulgación tienen dos características: una unidad o unidades monoméricas repetitivas, características de un polímero particular; y varios grupos funcionales reactivos, donde los grupos funcionales reactivos pueden ser iguales o diferentes, que se asocian con una unidad polimérica repetitiva.

A. Materiales poliméricos

Un experto en la técnica apreciará que se pueden usar materiales poliméricos distintos de poliacrilamidas para practicar los aspectos divulgados de la presente divulgación. Solo a modo de un aspecto de la presente divulgación, y sin limitación, estos materiales de la cadena principal polimérica adicionales incluyen:

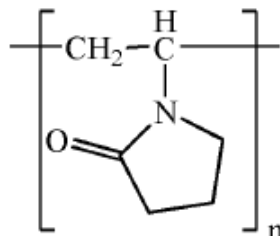
1. poli(ácidos acrílicos) [por ejemplo, $(\text{CH}_2\text{CHCO}_2\text{H})_n$];
2. polietileniminas [por ejemplo, $\text{H}(\text{NHCH}_2\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$];
3. poliestirensulfonatos, que típicamente tienen una fórmula



4. polisacáridos, que son una clase de carbohidratos de alto peso molecular en los que los monosacáridos se fijan de forma glucosídica con la eliminación de agua. Polisacárido se refiere típicamente a los polímeros que contienen 10 o más residuos de monosacáridos. Los polisacáridos tales como almidón, glucógeno, dextrano y poliglucósidos, pueden incluir varios miles de unidades. Los polímeros de peso molecular relativamente bajo, que consisten en de dos a nueve residuos de monosacáridos, se denominan oligosacáridos. A menos que se destaque de otro modo o el contexto lo indique claramente de otro modo, "polisacárido" como se usa en el presente documento incluye tanto oligosacáridos como polímeros que tienen más de 9 residuos de monosacáridos. Los polisacáridos, tales como celulosa o almidón, producen solo un tipo de monosacárido (D-glucosa) en la hidrólisis completa y, por tanto, se denominan homopolisacáridos. Los heteropolisacáridos, tales como ácido hialurónico, producen más de un tipo de monosacárido en la hidrólisis. Con referencia específica al ácido hialurónico, los monómeros son *N*-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico. Los polisacáridos ejemplares incluyen almidón, glucógeno, dextrano, carboximetilcelulosa, etc.);

5. poli(etileno-alt-ácido maleico);

6. poli(arginina), poli(asparagina), poli(ácido aspártico), poli(ácido glutámico), poli(glutamina) y poli(lisina); y
7. polivinilpirrolidona (PVP), que tiene típicamente una fórmula



Un experto en la técnica apreciará que los derivados de estos materiales poliméricos ejemplares son adecuados para su uso con los aspectos divulgados de la presente divulgación, y además que los materiales poliméricos además de los divulgados en el presente documento para ejemplificar la divulgación también se pueden usar como transportadores.

Determinados materiales poliméricos dentro de los aspectos de la presente divulgación se pueden obtener comercialmente. Por ejemplo, muchos de los polímeros divulgados están disponibles comercialmente de Aldrich en diversos pesos moleculares. De forma alternativa, se puede comprar o preparar un material polimérico, y a continuación derivatizarlo posteriormente para incluir los grupos funcionales deseados. Este procedimiento se puede ejemplificar haciendo referencia a las poliacrilamida-hidrácidas, por lo que una poliacrilamida se derivatiza para incluir varios grupos funcionales hidrácida por reacción mediada por microondas con hidracina. De forma similar, se pueden hacer reaccionar los polímeros, tales como poliacrilamidas, con cualquier compuesto sustituido, tal como aminoguanidinas. Aún como otro enfoque alternativo, las unidades monoméricas adecuadas para formar una cadena principal polimérica deseada, y que comprenden grupos funcionales deseados, se pueden polimerizar para formar transportadores poliméricos deseados de acuerdo con aspectos de la presente divulgación. Este procedimiento permite usar copolímeros alternos que comprenden unidades A y B alternas regulares, copolímeros periódicos con unidades A y B dispuestas en una secuencia repetitiva (por ejemplo, (A-B-A-B-B-A-A-A-B-B-B)_n), copolímeros aleatorios con secuencias aleatorias del monómero A y B, copolímeros estadísticos en los que el orden de los distintos monómeros dentro de la secuencia del polímero obedece a reglas estadísticas conocidas, copolímeros de bloque compuestos de dos o más subunidades de homopolímeros unidas por enlaces covalentes, unidades de homopolímero que tienen una subunidad no repetitiva intermedia, conocida como bloque de unión, copolímeros de bloque con dos o tres bloques distintos, tales como copolímeros dibloque y tribloque, copolímeros lineales que tienen una única cadena principal, copolímeros ramificados que tienen una única cadena principal con una o más cadenas laterales poliméricas, copolímeros de injerto que tienen cadenas laterales estructuralmente distintas de la cadena principal, copolímeros estrella, copolímeros cepillo, copolímeros peine, dendrímeros, etc.

El tamaño del material polimérico también puede ser una consideración importante para determinados aspectos de la presente divulgación. Para un aspecto de la presente divulgación, actualmente se cree que el peso molecular promedio del transportador polimérico debería ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 100.000, más típicamente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000, e incluso más típicamente de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 40.000, y aún incluso más típicamente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 30.000. Determinadas divulgaciones de poliacrilamida-hidrácida contemplan usar un material polimérico que tiene un peso molecular promedio de 10.000 o menos, aunque también se pueden usar poliacrilamidas que tienen pesos moleculares promedio sustancialmente mayores. Se puede proporcionar una guía adicional para seleccionar un peso molecular particular o una distribución de peso molecular para el polímero considerando las propiedades físicas del producto polimérico. Para un ejemplo de la presente divulgación, el peso molecular del transportador polimérico puede ser una consideración importante, tal como para determinar la solubilidad, en particular solubilidad acuosa, del transportador polimérico o la capacidad de los conjugados de transportador polimérico para penetrar en una muestra a la que se puede aplicar un conjugado y, por tanto, actuar como deseen. Un experto en la técnica también apreciará que un peso molecular promedio óptimo puede depender bien del material polimérico particular, el grupo o grupos funcionales reactivos y el uso previsto para el material.

Muchos de los aspectos divulgados de la presente divulgación son principalmente útiles para aplicaciones acuosas. Como resultado, preferentemente el transportador polimérico debe ser sustancialmente soluble en agua.

Las cadenas principales poliméricas usadas con aspectos de la presente divulgación pueden ser estructuras sustancialmente no reticuladas. De forma alternativa, la porción polimérica puede estar sustancialmente reticulada.

B. Grupos funcionales reactivos

Cualquier grupo funcional reactivo que se pueda usar para acoplar componentes como se divulga en el presente documento puede ser útil para practicar la presente divulgación. Determinados aspectos de la presente divulgación

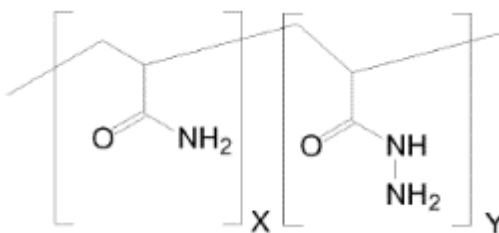
se refieren a grupos funcionales reactivos donde existen al menos dos heteroátomos adyacentes. Un propósito para seleccionar dichos grupos funcionales es aprovechar su nucleofilia incrementada, tal como puede resultar, sin limitar la divulgación a una teoría de funcionamiento, por el efecto alfa, en relación con los compuestos que pueden tener un grupo funcional que comprende uno o más heteroátomos, pero sin tener dos heteroátomos adyacentes. Determinados de dichos grupos funcionales ejemplares son hidracinas, hidracidas, hidroxilaminas ($-RNOH$), un hidracida-tiol, como se divulga en la solicitud de Estados Unidos "Molecular Conjugate" previa del cesionario n.º 11/603.425.

Con referencia específicamente a hidracidas, dichos grupos funcionales tienen típicamente una fórmula $-NR-NR_1R_2$, donde $R-R_2$ son hidrógeno. La hidracida puede ser una hidracida sustituida, es decir, donde al menos uno de $R-R_2$ es distinto de hidrógeno, de modo que $R-R_2$ son independientemente hidrógeno, alifático, tal como un grupo alquilo inferior (típicamente 20 o menos, e incluso más típicamente 10 o menos átomos de carbono), heteroalifático, aromático y/o heteroaromático. Como otro aspecto de la presente divulgación, también es posible usar grupos funcionales que son donantes de electrones de modo que la nucleofilia del heteroátomo atacante, tal como nitrógeno, se incrementa adicionalmente. Los grupos funcionales adecuados también pueden ser derivados de una hidracida. Dichos grupos funcionales ejemplares incluyen dihidracidas $[-(RN)-NR_1CO-NR_2-NR_3R_4]$, semicarbácidas $[-NRCO-NR_1NR_2R_3]$, tiosemicarbácidas $[-NR-CS-NR_1-NR_2R_3]$, tiocarbácidas $[-NR-NR_1-CS-NR_2-NR_3R_4]$, ácido carbónico-dihidracina $[-NR-CO-NR_1-NR_2-CO-NR_2-NR_4R_5]$, derivados que contienen azufre de ácido carbónico-dihidracinas, hidracina-carboxilatos $[-O-CO-NR-NR_1R_2]$, o derivados que contienen azufre de hidracina-carboxilatos, aminoguanidinas, etc. Con referencia a estos grupos ejemplares, $R-R_5$ típicamente son hidrógeno, pero también pueden ser independientemente hidrógeno, alifático, heteroalifático, aromático, heteroaromático, etc.

C. Obtención de transportadores poliméricos

Los aspectos divulgados de transportadores poliméricos en general se pueden comprar o se pueden preparar usando procedimientos conocidos en la técnica. Varias divulgaciones de trabajo ilustran transportadores poliméricos con referencia a poliacrilamida-hidracida, donde la cadena principal polimérica se basa en acrilamida, y el transportador comprende además varios grupos funcionales hidracida reactivos. La poliacrilamida se puede preparar como se divulga en el ejemplo ilustrativo 1.

A continuación se proporciona una fórmula general para poliacrilamida-hidracida.



Con referencia a esta fórmula general, X e Y pueden variar, pero típicamente X es de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, más típicamente de aproximadamente 300 a aproximadamente 400, e Y típicamente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, más típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50.

Muchas hidracidas poliméricas producidas antes de las aplicaciones de la presente divulgación eran polímeros relativamente grandes, y tenían solubilidad limitada, del orden de aproximadamente 5 miligramos/mililitro o menos. Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren principalmente a poliacrilamida-hidracidas que tienen una solubilidad acuosa sustancialmente incrementada de más de aproximadamente 5 miligramos/mililitro hasta saturación acuosa, típicamente más de aproximadamente 10 miligramos/mililitro hasta al menos aproximadamente 500 miligramos/mililitro, y preferentemente al menos 100 miligramos/mililitro, y más preferentemente al menos aproximadamente 250 miligramos/mililitro, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 300 miligramos/mililitro.

Otra característica importante es el pKa del grupo funcional hidracida, que es alrededor de 4. Si el pH es de aproximadamente 5 para reacciones que se pueden realizar usando la hidracida polimérica, entonces el nitrógeno de hidracida no está protonado y, por lo tanto, puede actuar como nucleófilo. Y a ese valor de pH, la hidracida actúa como un supernucleófilo. Para determinados aspectos divulgados de la presente divulgación, los grupos funcionales asociados con el transportador polimérico actúan como nucleófilos para acoplarse con compuestos de carbonilo producidos oxidando carbohidrato asociado con la porción Fc de un anticuerpo. La hidracida nucleófila es un buen grupo funcional para esta reacción. A la inversa, las aminas tienen un pKa de más de 9 y típicamente más de 10, y por tanto a un pH de aproximadamente 5 el grupo funcional amina está completamente protonado y, por tanto, no es nucleófilo. La hidracida se puede hacer reaccionar con un compuesto de carbonilo, por ejemplo, un aldehído. La reacción de la hidracida con los aldehídos puede ser catalizada por ácido. Esta diferencia permite reacciones quimiosselectivas. Para un aspecto de la presente divulgación, las aminas biológicas que pueden estar presentes en una muestra están totalmente protonadas a un pH de aproximadamente 5 o menos, y por tanto no son nucleófilas,

mientras que las hidracidas, hidracinas, derivados de hidracida, derivados de hidracina, etc., de la presente divulgación no están protonadas, y por tanto, disponibles para la reacción de forma quimiosselectiva.

D. Haptenos

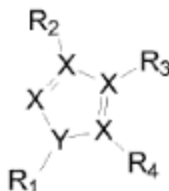
Uno de los usos principales de los aspectos divulgados de la presente divulgación es un transportador polimérico para haptenos. Los haptenos son moléculas pequeñas que pueden provocar una respuesta inmunitaria, pero típicamente solo cuando se acoplan a un transportador grande, tal como una proteína. Cualquier hapteno ahora conocido o en adelante descubierto probablemente se pueda usar con la presente divulgación. Los haptenos ejemplares conocidos incluyen dinitrofenol, biotina, digoxigenina, fluoresceína, rodamina, bromodesoxiuridina e inmunoglobulina de ratón.

Ventana Medical Systems, Inc. también es el cesionario de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 60/856.133, titulada "Haptens, Hapten Conjugates, Compositions Thereof and Method for Their Preparation and Use", que se presentó el 1 de noviembre de 2006 y la correspondiente solicitud de utilidad n.º 11/982.627. Estas solicitudes divulgan varias clases nuevas de haptenos, y especies particulares de las mismas, que son útiles para practicar aspectos de la presente divulgación. Estos haptenos incluyen pirazoles, en particular nitropirazoles; compuestos de nitrofenilo; benzofurazanos; triterpenos; ureas y tioureas, en particular fenilureas, e incluso más en particular feniltioureas; rotenona y derivados de rotenona, también denominados en el presente documento rotenoides; oxazol y tiazoles, en particular oxazol y tiazolsulfonamidas; cumarina y derivados de cumarina; ciclolignanos, ejemplificados por podofilotoxina y derivados de podofilotoxina; y combinaciones de los mismos.

Para las fórmulas generales proporcionadas a continuación, si no se indica ningún sustituyente, un experto en la técnica apreciará que el sustituyente es hidrógeno. Un enlace que no está conectado a un átomo, pero se muestra, para un aspecto de la presente divulgación, que se extiende al interior de un sistema de anillo, indica que la posición de dicho sustituyente es variable. Una línea curva dibujada a través de un enlace indica que alguna estructura adicional está unida a esa posición, típicamente un conector o el grupo funcional o resto usado para acoplar el hapteno a un transportador. Además, si no se indica una estereoquímica para los compuestos que tienen uno o más centros quirales, se incluyen todos los enantiómeros y diastereómeros. De forma similar, para una enumeración de grupos alifáticos o alquilo, se incluyen todos los isómeros estructurales de los mismos.

1. Azoles

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

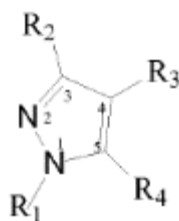


Con referencia a esta fórmula general, n es 0-2, más típicamente 0 o 1. R₁-R₄ pueden ser cualquier grupo orgánico que no interfiera con, y potencialmente facilite, la función como hapteno. Más específicamente, R₁-R₄ se seleccionan independientemente de: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX₃ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma), oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=) alcoholes (es decir, alifático o hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio o metales del Grupo I), cíclico, ciano (-CN), éster, éter, exometileno, halógeno, heteroarilo, heterocíclico, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes R₁-R₄ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos uno de los sustituyentes R₁-R₄ está unido a un conector o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o una molécula transportadora. R₁-R₄ más típicamente son grupos alifáticos, hidrógeno o nitro, incluso más típicamente alquilo, hidrógeno o nitro, y todavía incluso más típicamente alquilo inferior (10 o menos átomos de carbono), hidrógeno, nitro, o combinaciones de los mismos. El número de grupos nitro puede variar, pero lo más típicamente existen 1 o 2 grupos nitro. X independientemente es nitrógeno o carbono. Y es oxígeno, azufre o nitrógeno. Si Y es oxígeno o azufre, entonces no existe grupo R₁, y n=0. Si Y es nitrógeno, entonces existe al menos un grupo R₁.

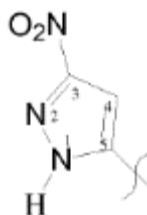
Un experto en la técnica apreciará que, para compuestos que tienen 2 o más grupos W, las posiciones relativas de los mismos son variables. Para un aspecto de la presente divulgación, un diazol podría tener átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 2, o las posiciones 1 y 3. Además, también son posibles más de dos heteroátomos, tales como con triazinas.

Al menos uno de R₁-R₄ para estos compuestos de azol está unido a algún otro grupo o es un grupo funcional variable. Para un aspecto de la presente divulgación, los compuestos ilustrados se pueden acoplar directamente a un transportador o a un conector en cualquiera de las posiciones adecuadas alrededor del anillo azol.

Los aspectos de trabajo de la presente divulgación fueron típicamente derivados de mono o dinitropirazol, de modo que al menos uno de R₁-R₄ es un grupo nitro, y quizás dos de R₁-R₄ son grupos nitro, usándose el R₁-R₄ restante para acoplar el hapteno a un conector o un transportador.

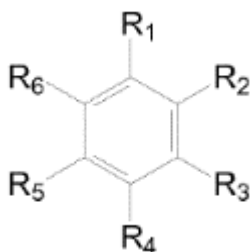


Un compuesto particular tuvo la siguiente estructura.



2. Nitroarilo

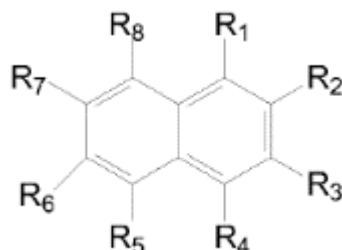
Una segunda clase general de haptenos de la presente divulgación son los compuestos de nitroarilo. Los compuestos de nitroarilo ejemplares incluyen, sin limitación, nitrofenilo, nitrobifenilo, nitrotrifenilo, etc., y cualquiera y todos los homólogos de heteroarilo, que tienen la siguiente fórmula química general.



Con referencia a esta fórmula general, dichos compuestos tienen al menos uno, y opcionalmente varios, grupos nitro. Por tanto, al menos uno de R₁-R₆ es nitro. Si más de uno de R₁-R₆ es nitro, todas las combinaciones de posiciones de anillo relativas de varios sustituyentes nitro, o sustituyentes nitro en relación con otros sustituyentes de anillo, se incluyen dentro de esta clase de haptenos divulgados. Los compuestos de dinitroarilo son los más típicos. Un experto en la técnica apreciará que a medida que se incrementa el número de grupos nitro, disminuye el número de sustituyentes de anillo restantes en la fórmula general. Estos sustituyentes se seleccionan independientemente de: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX₃ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma), oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=) alcoholes (es decir, alifático o hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilario, tal como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=),

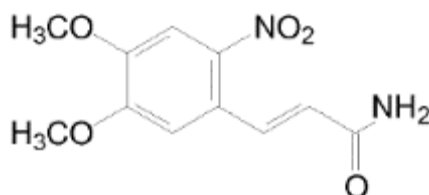
ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes R_1 - R_6 está unido a un conector o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o una molécula transportadora.

- 5 Dos o más de los sustituyentes R_1 - R_6 también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo, tal como naftaleno (mostrado a continuación) o derivados de tipo antraceno. Se pueden formar sistemas de anillo distintos de los sistemas de anillo de 6 miembros, tales como sistemas de anillo 6-5 fusionados.

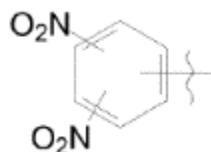


- 10 De nuevo, al menos una de las posiciones de anillo ocupadas por R_1 - R_8 está unida a un conector o es un grupo funcional variable adecuado para su acoplamiento, tal como por enlace covalente, a una molécula transportadora. Para un aspecto de la presente divulgación, los compuestos de nitroarilo de la presente divulgación pueden incluir un grupo funcional para su acoplamiento a un transportador, o a un conector, en diversas localizaciones de anillo
- 15 opcionales.

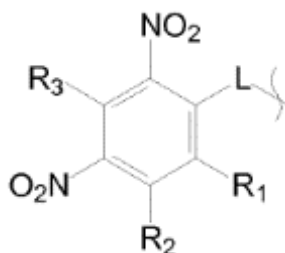
- Los aspectos de trabajo de la presente divulgación se ejemplifican por compuestos de nitrofenilo. Un aspecto de la presente divulgación, los compuestos de mononitroarilo se ejemplifican por compuestos de nitrocinamida. Una divulgación de un compuesto basado en nitrocinamida se ejemplifica por 4,5-dimetoxi-2-nitrocinamida, mostrado a continuación.
- 20



- 25 La clase de compuestos de nitrofenilo también se representa por compuestos de dinitrofenilo. Al menos uno de los átomos de carbono restantes de las posiciones de anillo que no tienen un grupo nitro está unido a un grupo funcional, a un conector, o directamente a un transportador. Cualquiera y todas las combinaciones de posiciones relativas de estos grupos se incluyen dentro de la clase de haptenos divulgados.



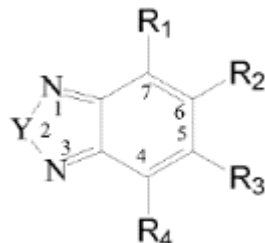
- 30 Los aspectos de trabajo de la presente divulgación se ejemplifican más en particular por compuestos de 2,4-dinitrofenilo acoplados a un conector, como se ilustra a continuación.



- 35 R_1 - R_3 son como se establece anteriormente. "L" es un conector, como se analiza con más detalle a continuación.

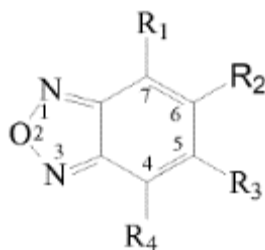
3. Benzofurazanos

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

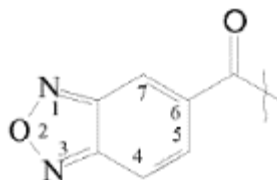


Los sustituyentes R_1 - R_4 se seleccionan independientemente de: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, tal como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 10 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, $-CX_3$ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma), oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, $CH_3-O-N=$) alcoholes (es decir, alifático o hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano ($-CN$), éster, éster alquílico, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima ($HO-N=$), ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrido, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes R_1 - R_4 también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos uno de los sustituyentes R_1 - R_4 está unido a un conector o directamente a un transportador. Y es un átomo de carbono que tiene sustituyentes R_5 y R_6 , donde R_5 y R_6 son como se establece para R_1 - R_4 , oxígeno o azufre, típicamente oxígeno.

Los compuestos donde Y es oxígeno se ejemplifican más en particular por compuestos que tienen la siguiente estructura, donde R_1 - R_4 son como se establece anteriormente, y lo más típicamente son independientemente hidrógeno y alquilo inferior.

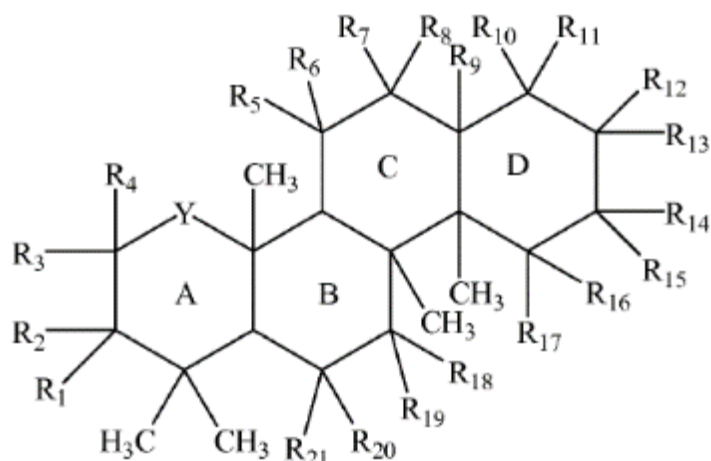


Una divulgación de trabajo de un compuesto de acuerdo con esta clase de haptenos tuvo la siguiente estructura química.



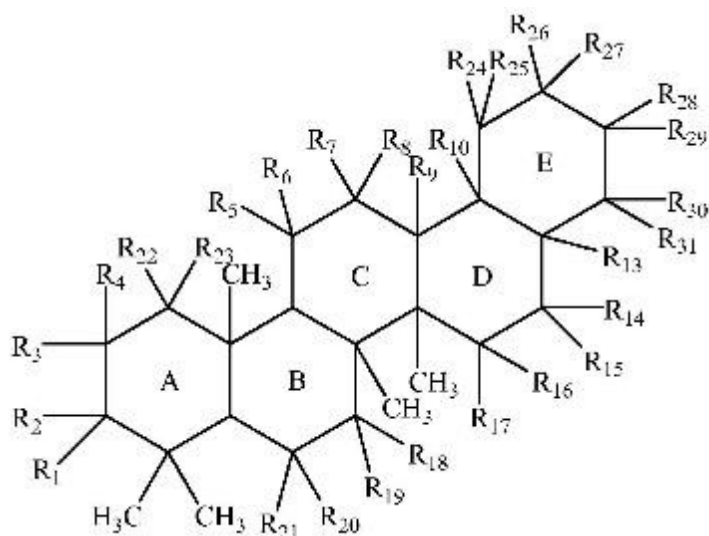
4. Triterpenos

Los triterpenos son otra clase de haptenos dentro del alcance de la presente divulgación. La estructura de anillo básica común a los triterpenos cíclicos tiene cuatro anillos fusionados de seis miembros, A-D, como se indica a continuación.

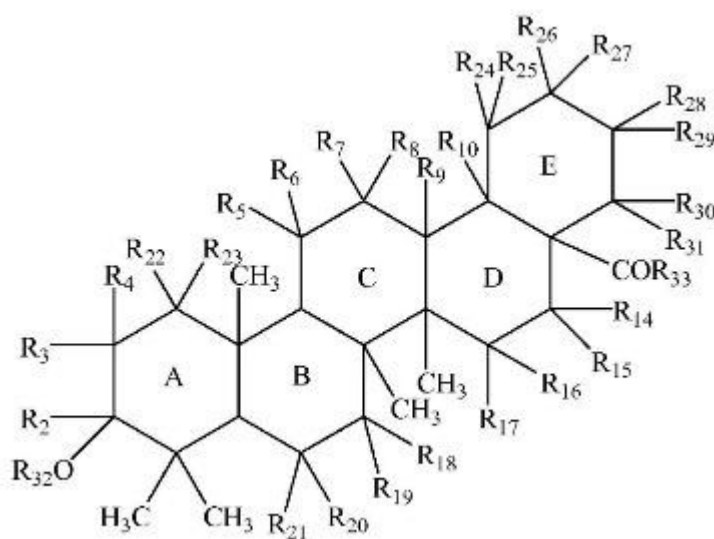


Varias publicaciones analizan las especies de triterpenos naturales, semisintéticas y sintéticas dentro del género de triterpenos útiles para practicar la presente divulgación, incluyendo: J.C. Connolly y R. A. Hill, Triterpenoids, Nat. Prod. Rep., **19**, 494-513 (2002); Baglin *et al.*, A Review of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

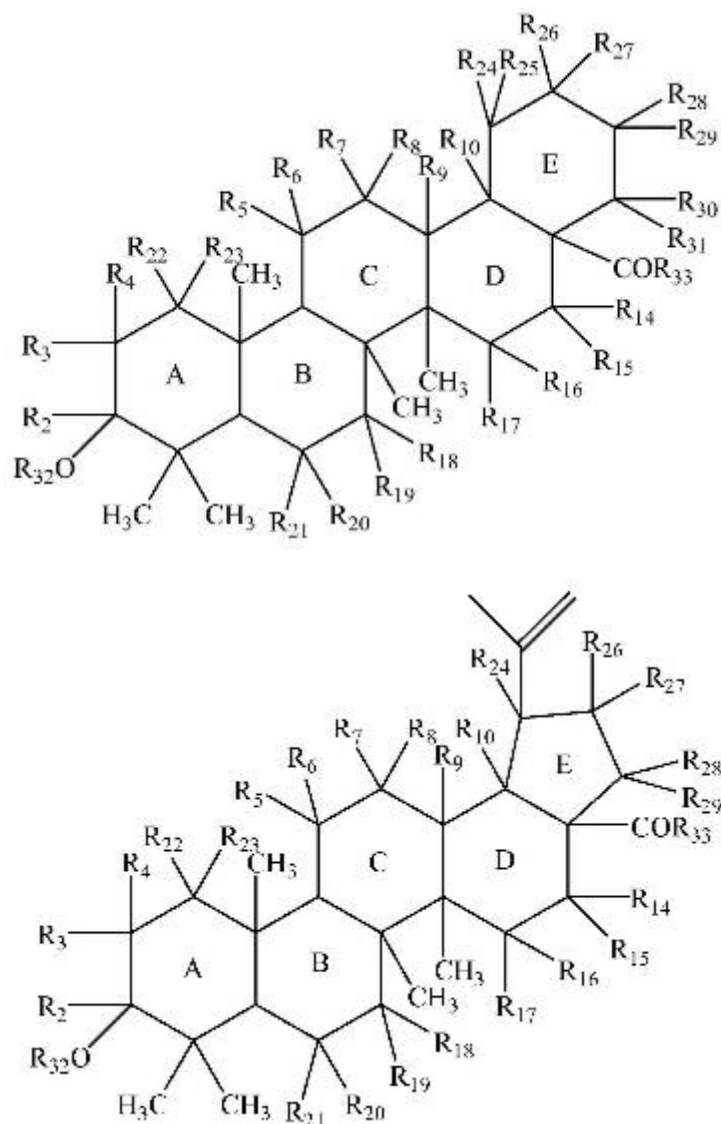
Las divulgaciones divulgadas de triterpenos que ejemplifican esta clase de haptenos también pueden incluir un anillo E, y este anillo E puede ser de diversos tamaños de anillo, en particular anillos que tienen 5-7 átomos, típicamente átomos de carbono, en el anillo. Para un aspecto de la presente divulgación, el anillo E podría ser un anillo de 6 miembros, como se indica por la siguiente fórmula general, donde R₁-R₃₁ son como se establece anteriormente para R₁-R₂₁.



Las siguientes fórmulas generales indican que el sustituyente R_{13} puede ser un grupo acilo que porta un sustituyente R_{33} seleccionado de hidrógeno, hidroxilo, éster, es decir, $-OR_{34}$ donde R_{34} es alifático, típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior, amido, incluyendo amida primaria ($-NH_2$), amida secundaria ($-NHR_{35}$) y amida terciaria ($-NR_{35}R_{36}$), donde R_{35} y R_{36} son alifáticos, típicamente alifático inferior, más típicamente alquilo, alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior o alquilo inferior sustituido. Esta fórmula general también indica que el sustituyente R_1 a menudo es un sustituyente OR_{32} , donde R_{32} es hidrógeno o alifático, más típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior. Los grupos R restantes son como se establece anteriormente con referencia a la primera fórmula general.



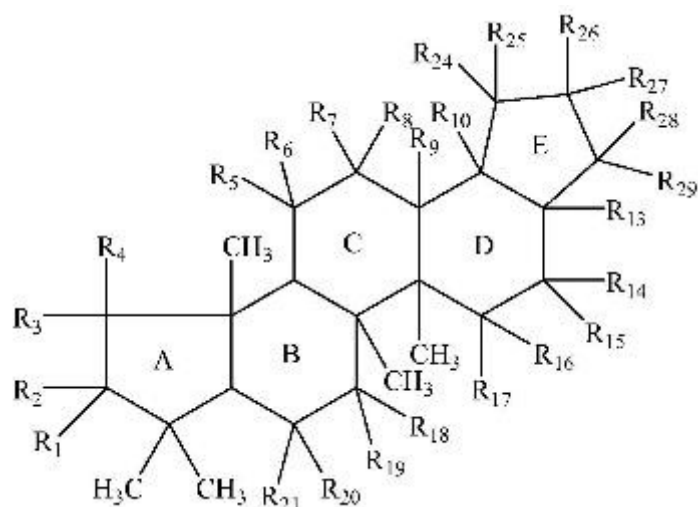
El anillo E también puede ser un anillo de 5 miembros, como se indica por la fórmula a continuación, donde los grupos R_1 - R_{29} son como se establece anteriormente para R_1 - R_{21} .



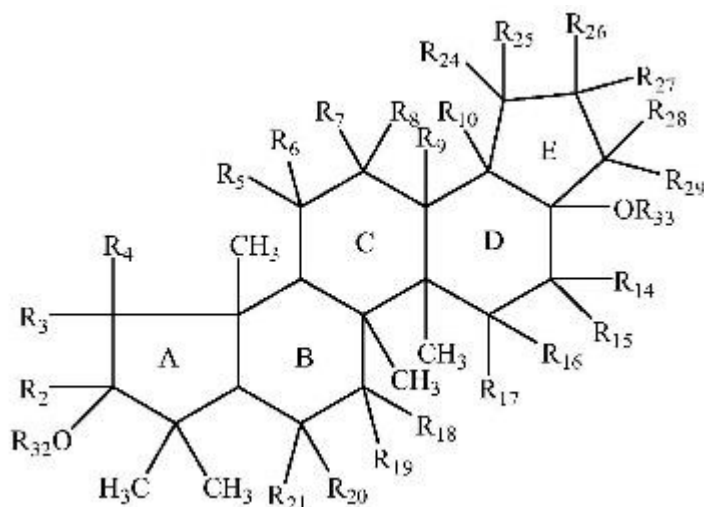
5 Con referencia a estas fórmulas generales, los grupos R₁-R₂₉ son como se establece anteriormente para R₁-R₂₁.

Como con compuestos ejemplares donde el anillo E es un anillo de 6 miembros, los compuestos donde el anillo E es un anillo de 5 miembros también pueden incluir sustituyentes en R₁ y R₁₃ como se analiza anteriormente. Específicamente, estas fórmulas generales indican que el sustituyente R₁₃ puede ser un grupo acilo que porta un sustituyente R₃₃ seleccionado de hidrógeno, hidroxilo, éster, es decir, -OR₃₄ donde R₃₄ es alifático, típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior, amido, incluyendo amida primaria (-NH₂), amida secundaria (-NHR₃₅) y amida terciaria (-NR₃₅R₃₆), donde R₃₅ y R₃₆ son alifáticos, típicamente alifático inferior, más típicamente alquilo, alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior o alquilo inferior sustituido. Esta fórmula general también indica que el sustituyente R₁ a menudo es un sustituyente OR₃₂, donde R₃₂ es hidrógeno o alifático, más típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior.

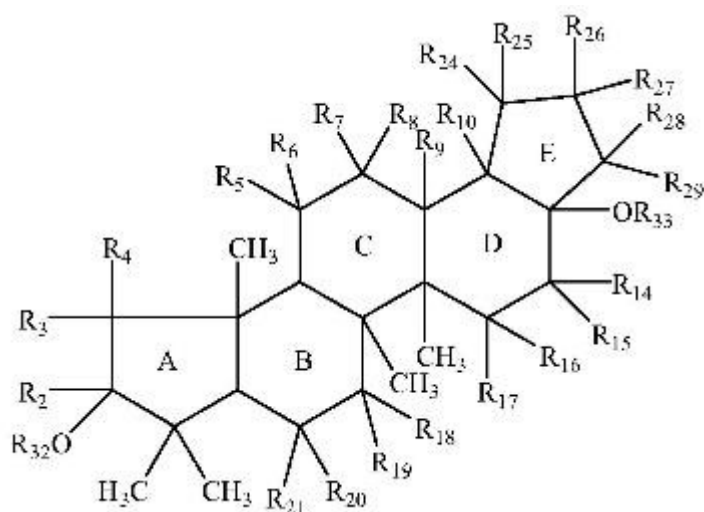
Los compuestos ejemplares también incluyen anillos de 5 miembros como tanto el anillo A como el E. Las fórmulas generales para dichos compuestos ejemplares se proporcionan a continuación, donde los sustituyentes R₁-R₂₉ son como se establece anteriormente.



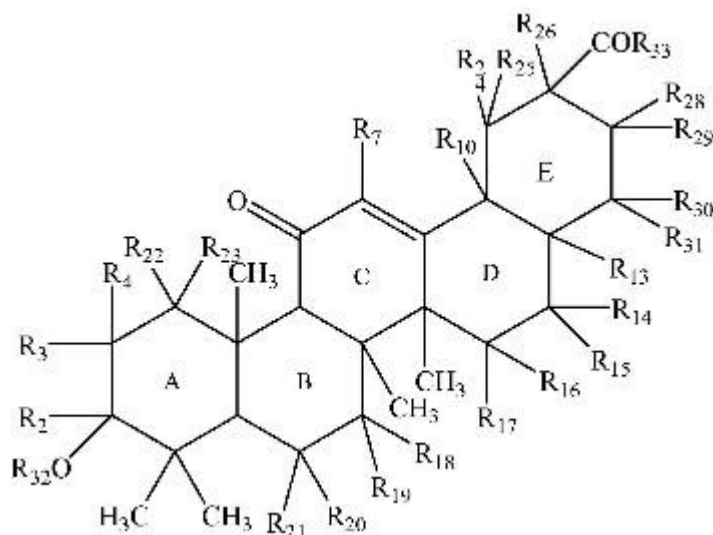
De nuevo, los sustituyentes R_1 y R_{13} pueden ser grupos funcionales basados en oxígeno. El sustituyente R_{13} puede ser un grupo acilo que porta un sustituyente R_{33} seleccionado de hidrógeno, hidroxilo, éster, es decir, $-OR_{34}$ donde R_{34} es alifático, típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior, amido, incluyendo amida primaria ($-NH_2$), amida secundaria ($-NHR_{35}$) y amida terciaria ($-NR_{35}R_{36}$), donde R_{35} y R_{36} son alifáticos, típicamente alifático inferior, más típicamente alquilo, alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior o alquilo inferior sustituido. Esta fórmula general también indica que el sustituyente R_1 a menudo es un sustituyente OR_{32} , donde R_{32} es hidrógeno o alifático, más típicamente alquilo o alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior.



Los triterpenos ejemplares de la presente divulgación también pueden incluir uno o más sitios de insaturación en uno o más de los anillos A-E. Los compuestos ejemplares a menudo tienen al menos un sitio de insaturación en el anillo C, tal como el doble enlace en el anillo C como se indica a continuación.



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



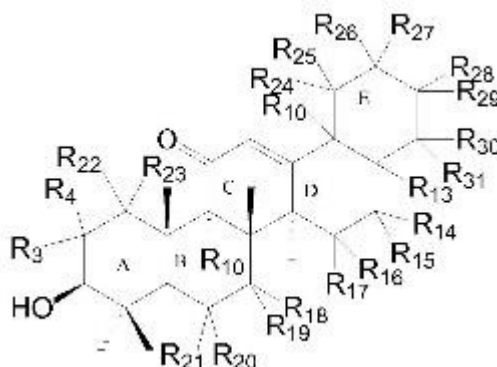
5

Los triterpenos también tienen varios átomos de carbono estereogénicos. Un experto en la técnica apreciará que los enantiómeros particulares tienen más probabilidades de producirse naturalmente. Aunque el enantiómero natural puede estar más disponible, y/o ser eficaz, para practicar los aspectos divulgados de la presente divulgación, todos los demás estereoisómeros posibles están dentro del alcance de la presente divulgación. Además, otros triterpenos naturales, o derivados sintéticos de los mismos, o compuestos completamente sintéticos, pueden tener (1) estereoquímica diferente, (2) diferentes sustituyentes, y además se pueden sustituir en posiciones que no se sustituyen en los compuestos naturales. Las fórmulas generales proporcionadas anteriormente no indican la estereoquímica en los centros quirales. Esto significa que ambos enantiómeros en cada centro quiral, y todas sus combinaciones de isómeros diastereómeros, están dentro del alcance de la presente divulgación.

10

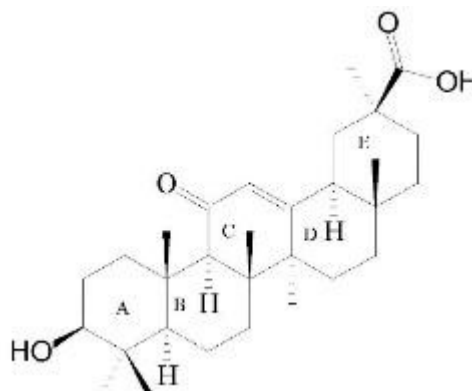
15

Los aspectos de trabajo particulares de la presente divulgación se ejemplifican por la siguiente fórmula general, en la que los sustituyentes son como se establece anteriormente.



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

5



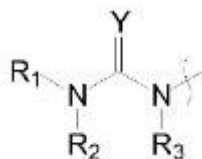
El grupo hidroxilo en el anillo A típicamente se oxida a un grupo funcional carbonilo en los aspectos de trabajo de la presente divulgación. Como resultado, el átomo de carbono que lleva el grupo carbonilo ya no es un centro quiral.

10

5. Ureas y tioureas

Ureas y tioureas, en particular aril y heteroarilureas y tioureas, son otra clase de haptenos dentro del alcance de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general para haptenos basados en urea de la presente divulgación.

15

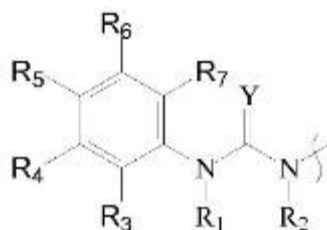


Con referencia a esta fórmula general, R₁-R₃ son independientemente hidrógeno, alifático, alifático sustituido, típicamente alquilo, alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior y alquilo inferior sustituido, cíclico, heterocíclico, arilo y heteroarilo. Más específicamente, R₁ típicamente es arilo o alifático, teniendo a menudo al menos un sitio de insaturación para facilitar la detección cromófora. R₂ y R₃ más típicamente son independientemente hidrógeno y alquilo inferior. Y es oxígeno (derivados de urea) o azufre (tioureas).

20

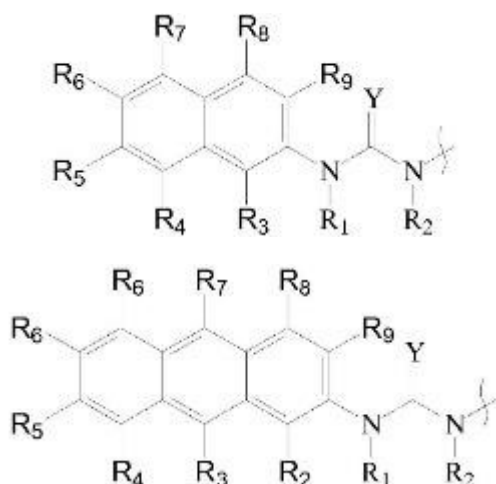
Los derivados de arilo típicamente tienen la siguiente fórmula.

25

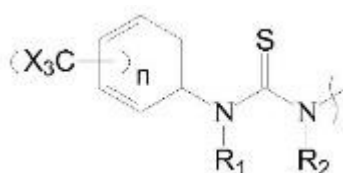


R₁-R₇ se seleccionan independientemente de: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, tal como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX₃ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma), oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=) alcoholes (es decir, alifático o hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éster alquílico, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes R₃-R₇ también está unido a un conector o a una molécula transportadora. Dos o más de estos sustituyentes R₃-R₇ disponibles para dicha unión también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada.

También pueden estar presentes anillos adicionales, como se indica por las estructuras ejemplares proporcionadas a continuación. Los grupos R son como se establece anteriormente para R₁-R₇ e Y es oxígeno o azufre.

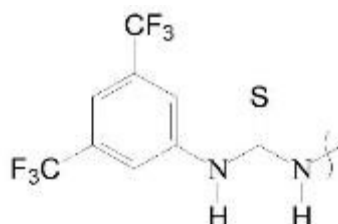


Una subclase particular de tioureas se representa a continuación.



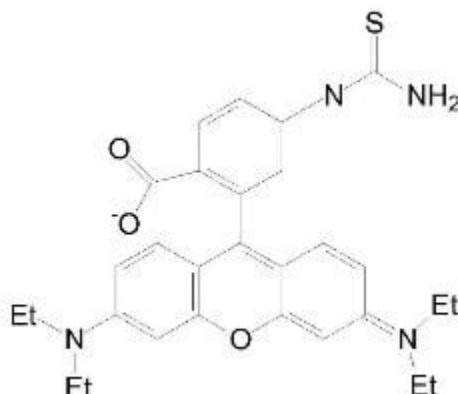
Con referencia a esta fórmula general, n es 1 a 5, típicamente 1-2, R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno o alquilo inferior, y X independientemente es un haluro o combinaciones de diferentes haluros.

A continuación se proporciona un aspecto de una divulgación de trabajo de una feniltiourea.



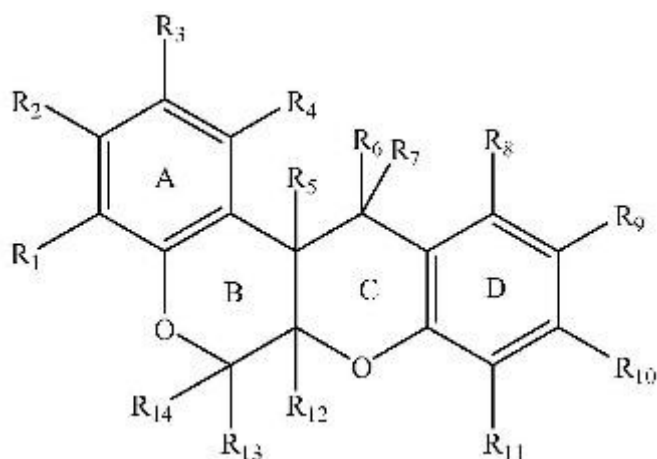
Los grupos trifluorometilo se muestran en las posiciones 3 y 5 en relación con el resto tiourea. Un experto en la técnica apreciará que los compuestos que tienen todas las posiciones relativas para compuestos disustituidos, tales como 2,4- y compuestos que tienen más de dos sustituyentes trihaloalquilo, en todas las posiciones relativas posibles de dichos varios sustituyentes trihaloalquilo, también están dentro del alcance de la presente divulgación. Un aspecto

particular de la presente divulgación de un hapteno de rodamina tiourea tiene la siguiente fórmula.



6. Rotenonas

La rotenona y haptenos basados en rotenona, denominados conjuntamente rotenoides, proporcionan otra clase de haptenos dentro del alcance de la presente divulgación. A continuación se proporciona una primera fórmula general para rotenona y haptenos basados en rotenona.



Varias publicaciones analizan los rotenoides naturales, semisintéticos y sintéticos que son útiles para describir el género de rotenoides útiles para practicar la presente divulgación, incluyendo: Leslie Crombie y Donald Whiting, Biosynthesis in the Rotenoids Group of Natural Products: Application of Isotope Methodology, Phytochemistry, **49**, 1479-1507 (1998); y Nianbai Fang y John Casida, Cube Resin Insecticide: Identification and Biological Activity of 29 Rotenoid Constituents. En base a la presente divulgación y aspectos de trabajo de la presente divulgación, así como divulgaciones proporcionadas por estas publicaciones previas, y con referencia a esta primera fórmula general, R₁-R₁₄ son independientemente hidrógeno, aldehído, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, tal como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX₃ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma) amino, aminoácido, amido, ciano (-CN), halógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=) hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior, carbonilo, ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, carboxilo, carboxilato (y sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I) éster, éster alquílico, acilo, exometileno, éter, cíclico, heterocíclico, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, heteroarilo, polisacáridos, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes R₁-R₁₄ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos uno de los sustituyentes R₁-R₁₄ también está unido a un conector o a una molécula transportadora.

Aunque R₆ y R₇ pueden ser como se establece anteriormente, más típicamente dichos sustituyentes son independientemente hidrógeno, OR₁₅, donde R₁₅ es hidrógeno, alifático, alifático sustituido, típicamente alquilo, alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior y alquilo inferior sustituido, tal como haluros de alquilo inferior, cíclico, heterocíclico, arilo y heteroarilo, -NR₂₁, donde R₂₁ es hidrógeno, alifático, alifático sustituido, típicamente

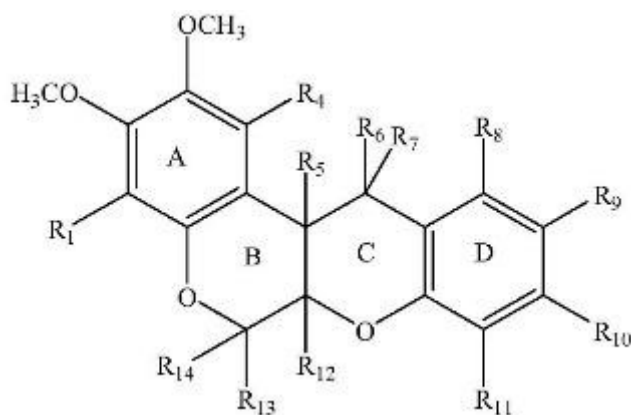
alquilo, alquilo sustituido, e incluso más típicamente alquilo inferior y alquilo inferior sustituido, tales como haluros de alquilo inferior, cíclico, heterocíclico, arilo y heteroarilo, o N-L-RG, donde L es un conector o un grupo reactivo, tal como una amina, como se analiza con más detalle en el presente documento.

5 R_6 y R_7 también pueden formar un doble enlace, tal como un doble enlace a un oxígeno para formar un carbonilo. Si R_6 y/o R_7 no son -L-RG, entonces al menos uno de los sustituyentes R está unido a un conector o a una molécula transportadora.

10 El anillo B también puede incluir al menos un sitio adicional de insaturación. Para un aspecto de la presente divulgación, R_5 y R_{12} pueden formar un doble enlace.

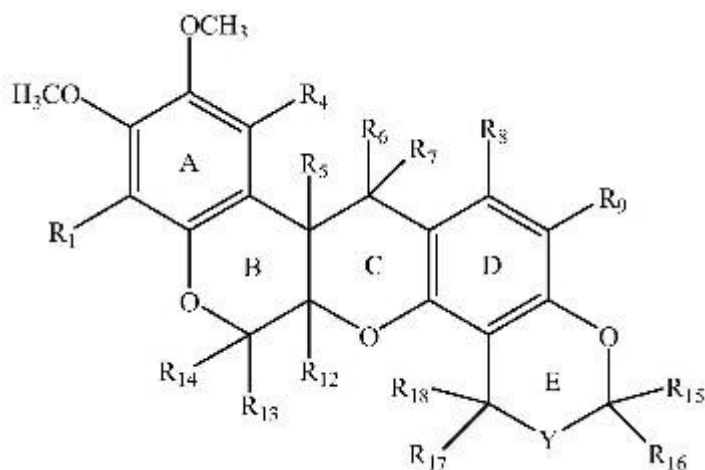
R_{10} y R_{11} se pueden fijar en un anillo de 5 o 6 miembros. Para un aspecto de la presente divulgación, R_{10} y R_{11} pueden definir un anillo pirano o furano, y más en particular es un anillo pirano o furano sustituido y/o insaturado.

15 Determinados haptenos basados en rotenona ejemplares de la presente divulgación también cumplen típicamente la siguiente segunda fórmula general.

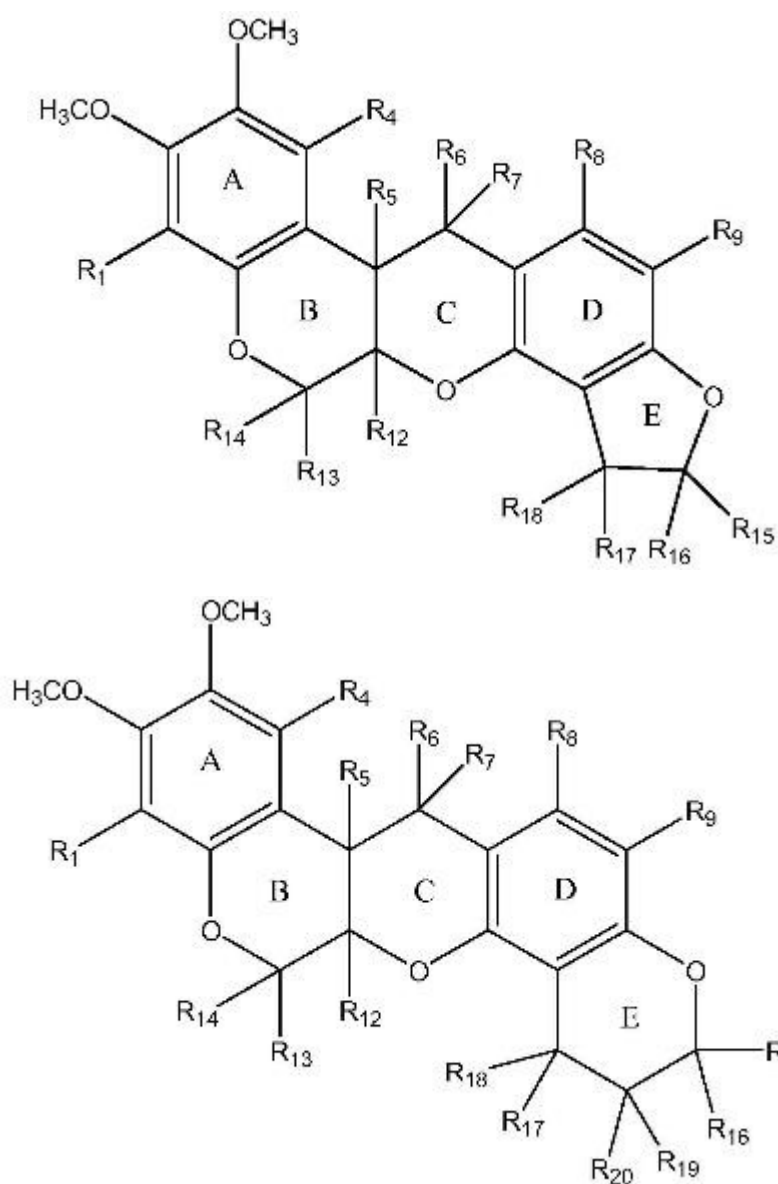


20 Con referencia a esta segunda fórmula general, los sustituyentes R son como se establece anteriormente. Si R_6 o R_7 no es -L-RG, entonces al menos uno de los grupos R restantes está unido a un conector o a un transportador.

25 R_{10} y R_{11} se pueden fijar en un anillo de 5 o 6 miembros, tal como un pirano o furano, y más en particular un anillo pirano o furano sustituido y/o insaturado. Por tanto, a continuación se proporciona una tercera fórmula general útil para describir determinados haptenos basados en rotenona de la presente divulgación, donde los sustituyentes R son como se establece anteriormente.

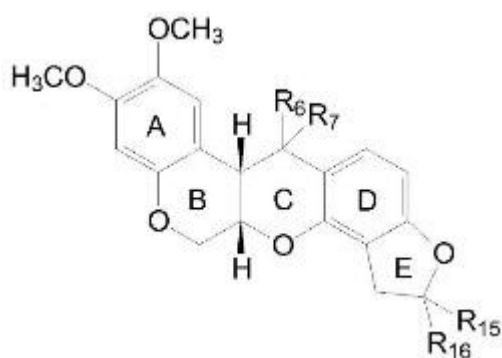


30 Y es un enlace, definiendo de este modo un anillo de 5 miembros, o es un átomo de carbono en un anillo de 6 miembros que porta los sustituyentes R_{19} y R_{20} , como se muestra a continuación, donde los sustituyentes R son como se establece anteriormente.



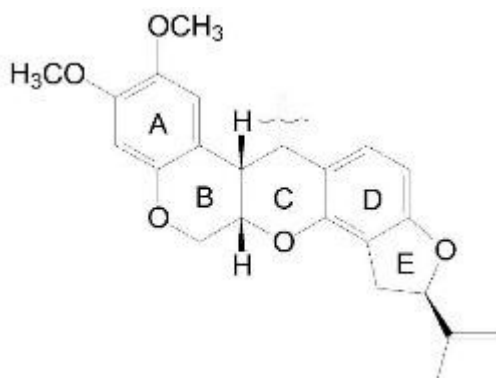
- 5 R₅ y R₁₂ en la unión de anillo se muestran sin indicar una estereoquímica particular. El compuesto natural tiene una unión de anillo *cis*, pero también son útiles mezclas racémicas para practicar la presente divulgación. Además, el estereoisómero *trans* se equilibra rápidamente para formar la mezcla racémica.

- 10 Las divulgaciones de trabajo de compuestos dentro de esta clase cumplen más típicamente la siguiente tercera fórmula general.



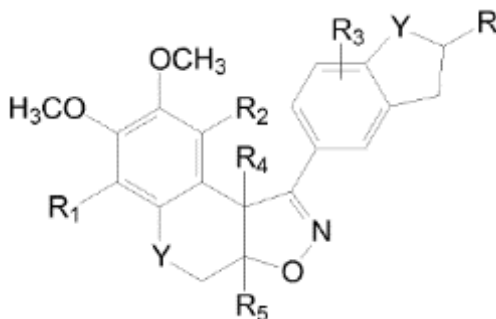
Con referencia a esta fórmula general, R₆ y R₇ son hidrógeno, alquilo, o definen un doble enlace, tal como a oxígeno

para formar un carbonilo. R_{15} y R_{16} son independientemente hidrógeno y alifático, típicamente alifático inferior, tal como alquenilo, del que un aspecto de la divulgación es isopreno, como se muestra a continuación.



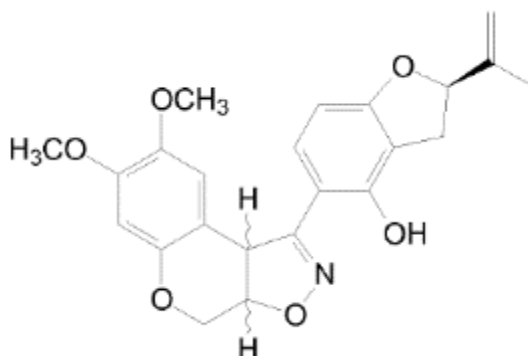
De nuevo, se muestra un enantiómero particular en la fórmula anterior, pero un experto en la técnica apreciará que el alcance de la presente divulgación no se limita al enantiómero particular mostrado. En su lugar, todos los estereoisómeros que actúan como haptenos también están dentro del alcance de la divulgación. Todas las sustituciones analizadas anteriormente para esta clase de compuestos se aplican a este compuesto particular. Otras sustituciones también son fácilmente evidentes para un experto en la técnica. Para un aspecto de la presente divulgación, los grupos metoxi en el anillo A pueden ser cualquier compuesto alcoxi, en particular grupos alcoxi inferior. La unidad de isopreno también proporciona una olefina que se puede modificar sintéticamente, quizás para proporcionar una posición alternativa, o al menos una segunda posición, para acoplar el hapteno a un conector o una molécula transportadora. Para un aspecto de la presente divulgación, la olefina se podría convertir en un alcohol por hidrobromación. También se podría convertir en un haluro o un epóxido para su uso como hapteno o bien como intermedios útiles para transformación adicional.

Una cuarta fórmula general para describir los haptenos basados en rotenona de la presente divulgación se refiere en particular a rotenona-isoxazolininas, como se proporciona a continuación.



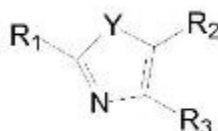
$R-R_5$ son independientemente hidrógeno, aldehído, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, incluyendo todos los isómeros de cadena ramificada, tal como isopreno, y todos los estereoisómeros, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, $-CX_3$ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma) amino, aminoácido, amido, ciano ($-CN$), halógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima ($HO-N=$), éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, $CH_3-O-N=$) hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior, carbonilo, ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, carboxilo, carboxilato (y sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I) éster, éster alquílico, acilo, exometileno, éter, cíclico, heterocíclico, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, heteroarilo, polisacáridos, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes $R-R_5$ también está unido a un conector o a una molécula transportadora. Y es oxígeno, nitrógeno o azufre.

A continuación se proporciona una divulgación de trabajo particular de un hapteno basado en rotenona que cumple esta cuarta fórmula general.



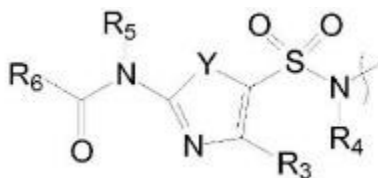
7. Oxazoles y tiazoles

- 5 Las oxazol y tiazolsulfonamidas proporcionan otra clase de haptenos dentro del alcance de la presente divulgación. A continuación se proporciona una fórmula general para oxazol y tiazolsulfonamidas.



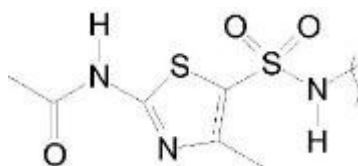
- 10 Con referencia a esta primera fórmula general, R₁-R₃ se seleccionan independientemente de: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, tal como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX₃ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma), oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=) alcoholes (es decir, alifático o hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éster alquílico, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrido, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más de estos sustituyentes R₁-R₃ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos uno de los sustituyentes R₁-R₃ está unido a un conector o es un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a un conector o una molécula transportadora. Y es oxígeno o azufre, típicamente azufre.

- Para determinados aspectos de trabajo ejemplares de la presente divulgación, R₁ ha sido amido, tal como los derivados de amida mostrados a continuación. R₂ proporciona una posición para acoplarse a un conector o a una molécula transportadora, aunque las posiciones indicadas por R₁ y R₂ también proporcionan posiciones alternativas o adicionales para acoplarse a un conector y/o molécula transportadora. R₂, para determinados aspectos de trabajo de la presente divulgación, ha sido -SO₂, y se ha usado para acoplar conectores formando una sulfonamida. Por tanto, una segunda fórmula general para las divulgaciones de trabajo de haptenos que ejemplifican esta clase de haptenos de trabajo se indica a continuación, donde los sustituyentes R₃-R₆ e Y son como se establece anteriormente.

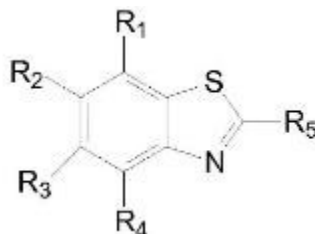


- 35 Para determinados aspectos de trabajo de la presente divulgación R₆ ha sido alquilo, en particular alquilo inferior, tal como metilo, e Y ha sido azufre.

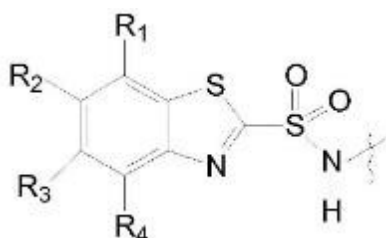
- 40 Una divulgación de trabajo de un compuesto de acuerdo con esta clase de haptenos tuvo la siguiente estructura química.



El tiazol u oxazol también podría ser parte de un sistema de anillo más grande. Para un aspecto de la presente divulgación, el oxazol o tiazol de 5 miembros podría estar acoplado a al menos un anillo adicional, tal como un anillo fenilo, como se indica a continuación.

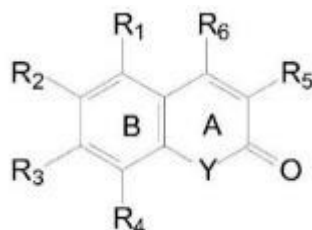


Aunque los grupos R_1 - R_5 en general pueden ser como se establece anteriormente, dichos compuestos también proporcionan una posición para acoplarse a un conector y/o a una molécula transportadora, tal como un R_5 . A continuación se proporciona un posible derivado de sulfonamida.



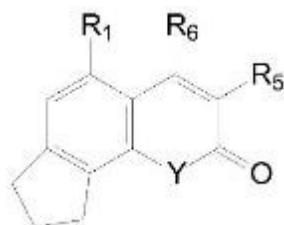
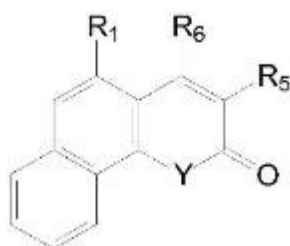
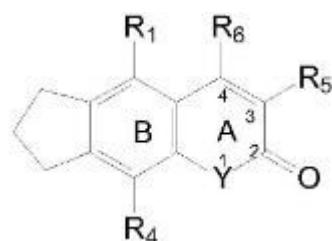
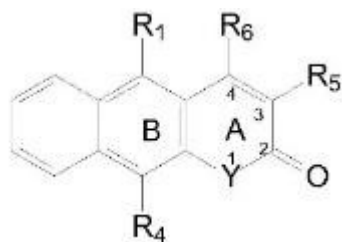
8. Cumarinas

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



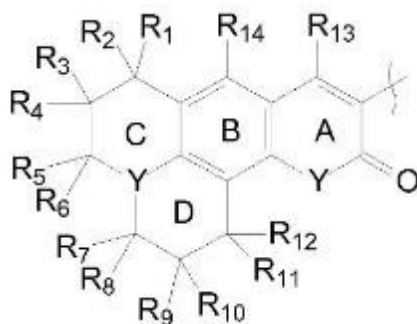
Con referencia a esta fórmula general, R_1 - R_6 se seleccionan independientemente de: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, tal como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, $-CX_3$ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma), oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, $CH_3-O-N=$) alcoholes (es decir, alifático o hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano ($-CN$), éster, éster alquílico, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima ($HO-N=$), ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Al menos uno de los sustituyentes R_1 - R_6 también está unido típicamente a un conector o a una molécula transportadora. Determinados aspectos de trabajo de la presente divulgación han usado la posición indicada por tener un sustituyente R_5 para acoplarse a un conector o molécula transportadora. La posición 4 puede ser importante si se usa la fluorescencia para detectar estos compuestos. Se cree que los sustituyentes distintos de hidrógeno en la posición 4 desactivan la fluorescencia, aunque dichos derivados todavía pueden ser cromóforos. Y es oxígeno, nitrógeno o

azufre. Dos o más de los sustituyentes R_1 - R_6 disponibles para formar dichos compuestos también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. A continuación se proporcionan divulgaciones ejemplares de estos tipos de compuestos.

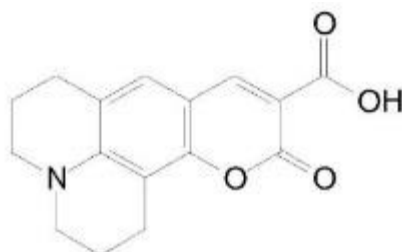


Un experto en la técnica apreciará que los anillos también podrían ser heterocíclicos y/o heteroarilos.

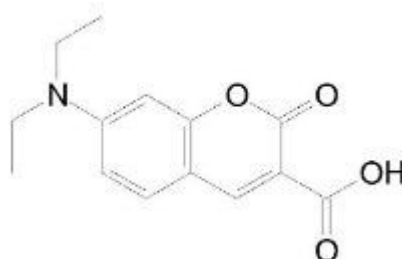
- 15 Los aspectos de trabajo de la presente divulgación típicamente fueron sistemas de anillo A-D fusionados que tienen al menos una posición de acoplamiento de molécula transportadora, indicándose una posible posición de acoplamiento a continuación.



Con referencia a esta fórmula general, los grupos variables R e Y son como se establece anteriormente. Más típicamente, R_1 - R_{14} son independientemente hidrógeno o alquilo inferior. Las divulgaciones particulares de haptenos basados en cumarina incluyen ácido 2,3,6,7-tetrahidro-11-oxo-1H,5H,11H-[1]benzopirano[6,7,8-ij]quinolizina-10-carboxílico

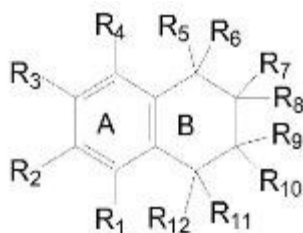


y dietilcumarina



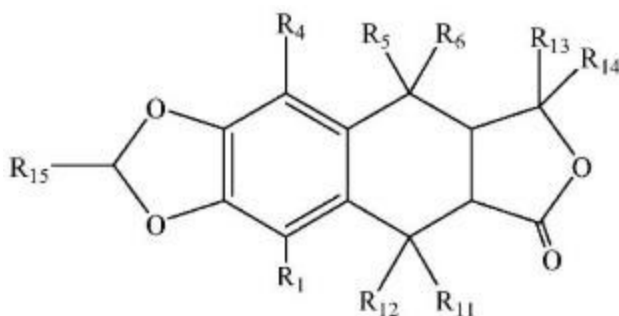
9. Ciclolignanos

Los compuestos basados en lignina, en particular ciclolignanos, tales como podofilotoxina y derivados de la misma, proporcionan otra clase de haptenos dentro del alcance de la presente divulgación. A continuación se proporciona una primera fórmula general para estos derivados basados en ciclolignina.

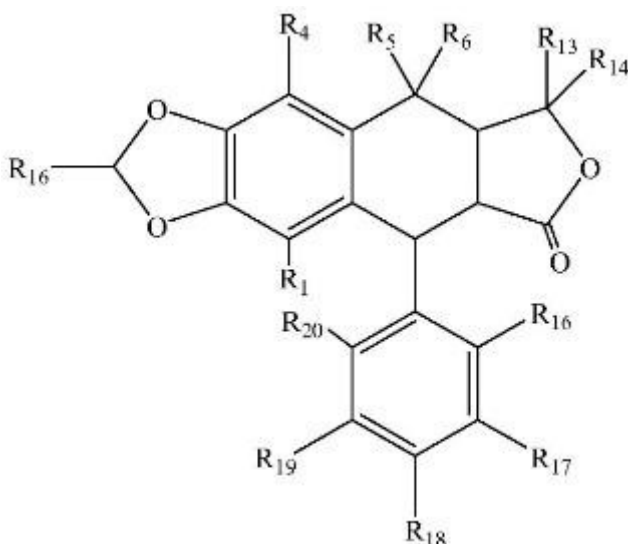


Varias publicaciones analizan los ciclolignanos naturales, semisintéticos y sintéticos que son útiles para describir el género de ciclolignanos útiles para practicar la presente divulgación, incluyendo: Stephanie Desbene y Sylviane Giorgi-Renault, *Drugs that Inhibit Tubulin Polymerization: The Particular Case of Podophyllotoxin and Analogues*, Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents, **2**, 71-90 (2002); M. Gordaliza *et al.*, *Podophyllotoxin: Distribution, Sources, Applications and New Cytotoxic Derivatives*, Toxicon, **44**, 441-459 (2004); Phillipe Meresse *et al.*, *Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry*, Current Medicinal Chemistry, **11**, 2443-2466 (2004); M. Pujol *et al.*, *Synthesis and Biological Activity of New Class of Dioxxygenated Anticancer Agents*, Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents, **5**, 215-237 (2005); y Youngjae You, *Podophyllotoxin Derivatives: Current Synthetic Approaches for New Anticancer Agents*, Current Pharmaceutical Design, **11**, 1695-1717 (2005). En base a la presente divulgación y aspectos de trabajo de la presente divulgación, así como divulgaciones proporcionadas por estas publicaciones previas, y con referencia a esta primera fórmula general, R_1 - R_{12} típicamente se seleccionan de hidrógeno, aldehído, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, tal como isopreno, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, $-CX_3$ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma) amino, aminoácido, amido, ciano ($-CN$), halógeno, hidroxilo, hidroxilamina, oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, $CH_3-O-N=$) hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior, carbonilo, ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, carboxilo, carboxilato (y sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I) éster, éster alquílico, acilo, exometileno, éter, cíclico, heterocíclico, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, heteroarilo, polisacáridos, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, y combinaciones de los mismos. Al menos uno de R_1 - R_{12} proporciona una posición para acoplar el compuesto a un conector o a una molécula transportadora. Además, algunos de los grupos R pueden ser átomos en un sistema de anillo. Para un aspecto de la presente divulgación, R_2 y R_3 , así como dos de R_7 - R_{10} , se pueden fijar conjuntamente en un sistema de anillo. Al menos uno de R_{12} y R_{11} también es a menudo un grupo arilo, tal como un anillo de benceno o un anillo de benceno sustituido.

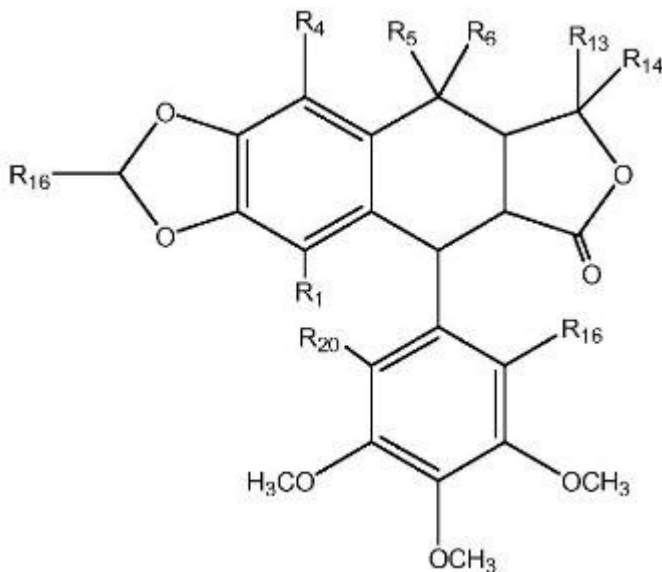
Determinados aspectos de trabajo de la presente divulgación también cumplen la siguiente segunda fórmula general, donde los sustituyentes R son como se establece anteriormente.



- 5 Los compuestos ejemplares donde al menos uno de R₁₁ y R₁₂ es un grupo arilo tienen la siguiente fórmula general, donde los sustituyentes R son como se establece anteriormente.



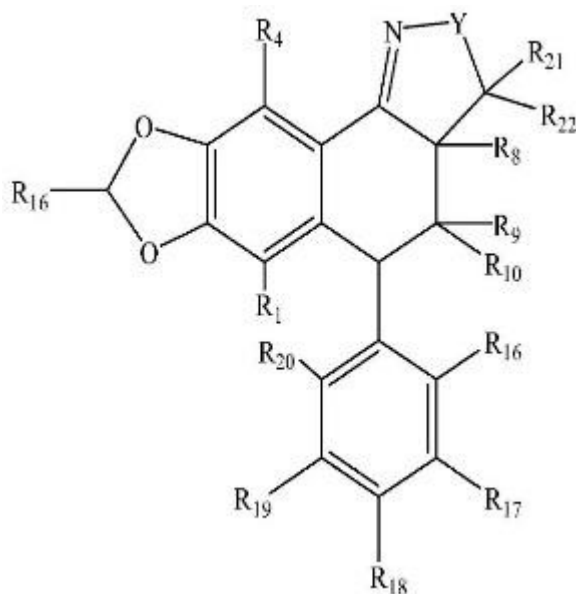
- 10 R₁₆-R₂₀ son en general como se establece anteriormente, pero más típicamente son independientemente hidrógeno o alcoxi, típicamente alcoxi inferior, tal como metoxi, como se muestra a continuación.



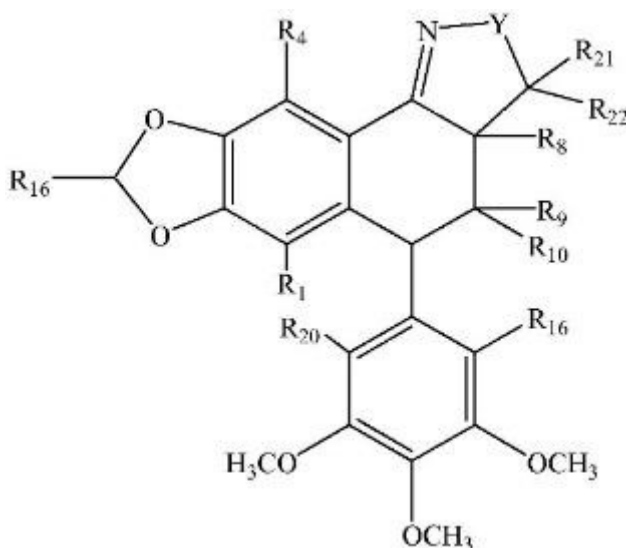
- 15 Al menos uno de los sustituyentes R está unido típicamente a un conector, es un grupo funcional reactivo que puede

reaccionar con un conector, o es -L-RG. Para un aspecto de la presente divulgación, R₅ a menudo es -L-RG.

R₅ y R₆ también pueden formar un doble enlace, tal como un doble enlace a oxígeno para formar un grupo funcional carbonilo o un doble enlace a un átomo de nitrógeno para formar una imina. Determinados compuestos ejemplares donde R₅ y R₆ forman un doble enlace tuvieron la siguiente fórmula general, donde los sustituyentes R restantes son como se establece anteriormente. Y se selecciona de nitrógeno, oxígeno o azufre. Si Y es nitrógeno, entonces el átomo de nitrógeno puede estar unido además a hidrógeno, o algún átomo, grupo funcional o resto químico distinto de hidrógeno. Para un aspecto de la presente divulgación, el nitrógeno puede tener un sustituyente alifático, tal como un grupo alquilo, un sustituyente arilo o heteroarilo, o un sustituyente arilo o heteroarilo sustituido, tal como un sustituyente arilo o heteroarilo sustituido con alquilo y/o alcoxi.

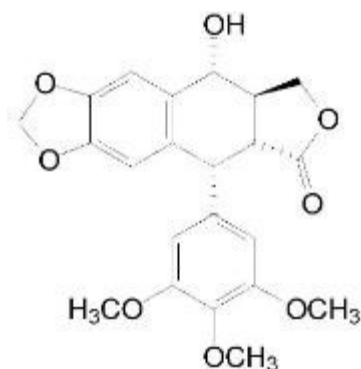


R₁₆-R₂₀ se seleccionan independientemente de hidrógeno y alcoxi, más típicamente alcoxi inferior, tal como metoxi, como se indica a continuación.



Como con todos los conjugados de hapteno de la presente divulgación, al menos uno de los sustituyentes R está unido típicamente a un conector, es un grupo funcional reactivo que puede reaccionar con un conector, es -L-RG, o está directamente unido a un transportador. Para un aspecto de la divulgación, R₉ a menudo es -L-RG.

A continuación se proporciona la estructura química para podofilotoxina, un compuesto que ejemplifica esta clase de haptenos ciclolignan.

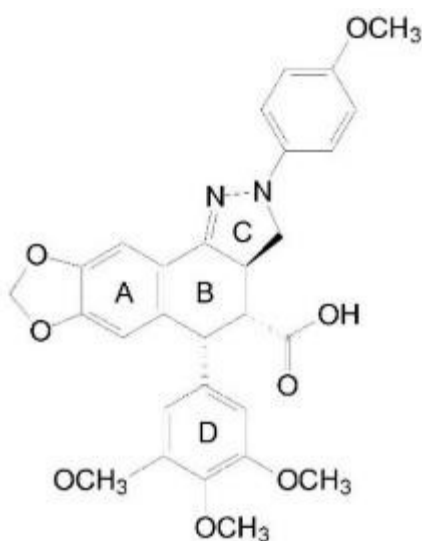


La podofilotoxina, también denominada podofilox, es una toxina no alcaloide que tiene un peso molecular de 414,40 y una fórmula de composición de $C_{22}H_{22}O_8$. La podofilotoxina está presente en concentraciones de un 0,3 a un 1,0 % en masa en el rizoma de la mandrágora americana *Podophyllum peltatum*. El punto de fusión de podofilotoxina es de 183,3 - 184,0 °C.

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



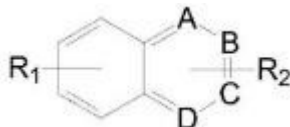
A continuación se muestra una divulgación específica de un hapteno ciclolignano de acuerdo con la presente divulgación.



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

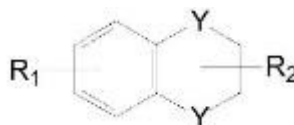
10. Heterobiarilo

Otra clase general de haptenos de la presente divulgación son los compuestos heterobiarilo, típicamente fenilquinolinas y quinoxalinas. Los compuestos heterobiarilo divulgados tienen una primera fórmula química general como sigue.



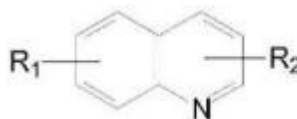
Con referencia a estas fórmulas generales, A-D se seleccionan de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, y cualquiera y todas las combinaciones de los mismos. Más típicamente A-D son carbono o nitrógeno. Los sustituyentes R₁-R₂ se seleccionan independientemente de: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX₃ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma), oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=) alcoholes (es decir, alifático o hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, alcoxiarilo, tal como metoxi y etoxi, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éster alquílico, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrilo, sulfonilo, sulfóxido, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más de los sustituyentes R₁-R₂, lo más típicamente varios sustituyentes R₁ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Al menos uno de los sustituyentes R₁-R₂ típicamente está unido a un conector o directamente a un transportador.

Las divulgaciones particulares de los compuestos heterobiarilo tienen la siguiente fórmula.

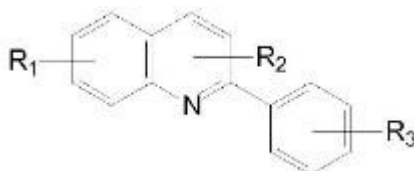


R₁ y R₂ son como se establece anteriormente para la primera fórmula general. Y es oxígeno, nitrógeno o azufre, típicamente nitrógeno. Si Y es nitrógeno, entonces la fórmula también puede incluir dobles enlaces al uno o más átomos de nitrógeno.

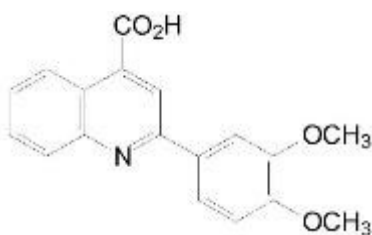
Los compuestos que tienen un único heteroátomo se ejemplifican por fenilquinolinas, tal como sigue.



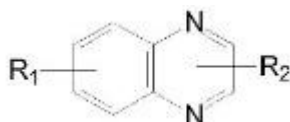
Los aspectos más particulares de la presente divulgación incluyen haptenos sustituidos con arilo, ejemplificados por la siguiente fórmula general.



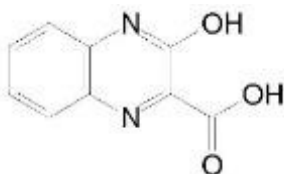
Con referencia a esta fórmula general, R₁-R₃ son como se indica anteriormente. Más típicamente, R₁ es hidrógeno, R₂ es acilo, y R₃ es alcoxi. A continuación se proporciona un aspecto particular de la divulgación, el ácido 2-(3,4-dimetoxifenil)quinolina-4-carboxílico.



Los compuestos que tienen dos heteroátomos están representados por quinoxalinas, como se indica en la fórmula general a continuación.

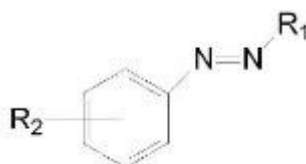


Una divulgación particular del hapteno con biaril-diheteroátomo de la presente divulgación se ejemplifica por 3-hidroxi-2-quinoxalincarbamida, a continuación. De nuevo, los sustituyentes R₁ y R₂ son como se establece anteriormente con respecto a esta clase de haptenos.



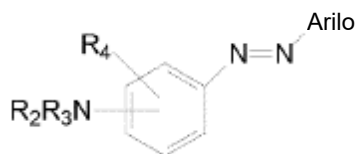
11. Azoarilo

Otra clase general de haptenos de la presente divulgación son compuestos de azoarilo, tales como azobencenos, que tienen una primera fórmula química general como sigue.



Los sustituyentes R₁-R₂ se seleccionan independientemente de: hidrógeno, acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos átomos de carbono, e incluso más típicamente alquilo inferior que tiene 10 o menos átomos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, alquilo sustituido, tal como haluro de alquilo (por ejemplo, -CX₃ donde X es un haluro, y combinaciones de los mismos, en la cadena o bien unidos a la misma), oxima, éter de oxima (por ejemplo, metoxiimina, CH₃-O-N=) alcoholes (es decir, alifático o hidroxilalquilo, en particular hidroxilalquilo inferior) amido, amino, aminoácido, arilo, alquilarilo, tal como bencilo, alcoxiarilo, tal como metoxi y etoxi, carbohidrato, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como sacarosa y lactosa, oligosacáridos y polisacáridos, carbonilo, carboxilo, carboxilato (incluyendo sales de los mismos, tales como carboxilatos de iones de amonio y metales del Grupo I), cíclico, heterocíclico, ciano (-CN), éster, éster alquílico, éter, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, hidroxilamina, oxima (HO-N=), ceto, tal como cetonas alifáticas, nitro, sulfhidrido, sulfonilo, sulfóxido, sulfonilo, exometileno y combinaciones de los mismos. Dos o más sustituyentes R₂ también pueden ser átomos, típicamente átomos de carbono, en un sistema de anillo unido o fusionado a los compuestos que tienen la fórmula general ilustrada. Para un aspecto de la divulgación, 2 sustituyentes R₂ pueden formar un anillo fenilo fusionado, o una estructura heterocíclica o heteroarilo fusionada.

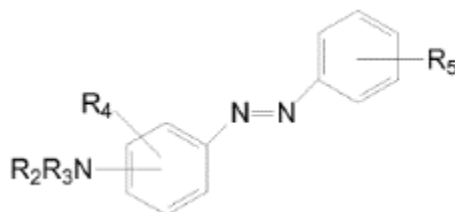
Determinados compuestos de azoarilo divulgados tienen un primer sustituyente amina y un segundo sustituyente arilo. Estos compuestos típicamente tienen la siguiente fórmula.



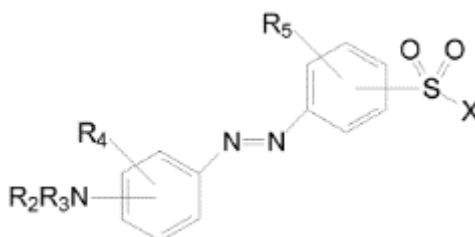
Con referencia a esta fórmula general, R₂-R₄ son como se establece anteriormente con respecto a esta clase de haptenos, teniendo aspectos particulares de la presente divulgación R₂-R₃ alifático, en particular alquilo, más en particular alquilo inferior, y R₄ hidrógeno.

5

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



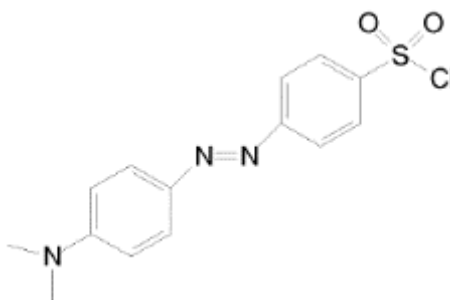
10 R₂-R₅ son como se establece anteriormente para esta clase particular de haptenos. Al menos uno de R₂-R₅ define una posición para acoplar un conector o transportador al hapteno azoarilo para formar un conjugado. Para un aspecto de la divulgación, R₅ puede ser un grupo funcional de haluro de sulfonilo. Los haluros de sulfonilo, tales como el que se muestra a continuación, son grupos funcionales útiles para acoplar conectores a los haptenos azoarilo.



15

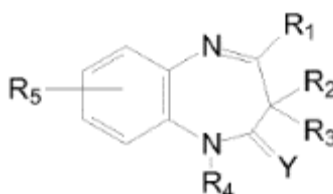
Con referencia a esta fórmula, R₂-R₅ son como se establece anteriormente. X es un haluro. Una divulgación particular de estos haptenos azoarilo, cloruro de 4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonilo, tiene la fórmula proporcionada a continuación.

20



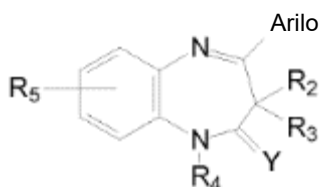
12. Benzodiazepinas

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

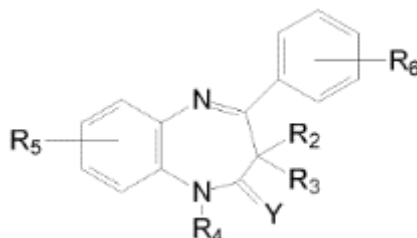


R₁-R₅ se seleccionan independientemente de: acilo, aldehídos, alcoxi, alifático, en particular alifático inferior, alifático sustituido, heteroalifático, por ejemplo, cadenas orgánicas que tienen heteroátomos, tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, alquilo, en particular alquilo que tiene 20 o menos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

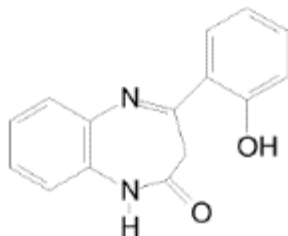
Las divulgaciones particulares de los haptenos benzodiazepina tienen R₁ arilo, como se indica a continuación.



Para estos aspectos de la presente divulgación, R₂-R₅ son como se establece anteriormente para esta clase de haptenos, más típicamente dichos sustituyentes se seleccionan independientemente de alifático, en particular alquilo, hidrógeno e hidroxilo. Determinados aspectos divulgados de la presente divulgación son compuestos fenilo, como se ilustra a continuación.



De nuevo, R₂-R₆ son como se establece anteriormente, pero más típicamente dichos sustituyentes se seleccionan independientemente de alifático, en particular alquilo, hidrógeno e hidroxilo. Determinados aspectos divulgados de la presente divulgación son compuestos fenilo, como se ilustra a continuación. A continuación se proporciona un aspecto particular de la presente divulgación, 4-(2-hidroxifenil)-1H-benzo[b][1,4]diazepin-2(3H)-ona.



E. Conectores

1. General

Como se indica en la fórmula general, los conjugados transportador-conector con hapteno opcional de la presente solicitud pueden incluir conectores. Cualquier conector actualmente conocido para este propósito, o desarrollado en el futuro, se puede usar para formar conjugados de la presente divulgación por el acoplamiento a los haptenos divulgados en el presente documento. Los conectores útiles pueden ser homo o bien heterobifuncionales, pero más típicamente son heterobifuncionales.

2. Alifático

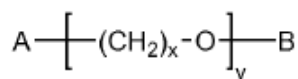
Únicamente a modo de divulgación, y sin limitación, una primera clase de conectores adecuados para formar conjugados de hapteno divulgados son compuestos alifáticos, tales como cadenas de hidrocarburos alifáticos que tienen uno o más sitios de insaturación, o cadenas de alquilo. La cadena alifática también incluye típicamente grupos funcionales terminales, incluyendo a modo de divulgación y sin limitación, un grupo reactivo de carbonilo, un grupo reactivo de amina, un grupo reactivo de tiol o un grupo fotorreactivo, que facilitan el acoplamiento a haptenos y otros compuestos deseados, tales como restos de unión específica. La longitud de la cadena puede variar, pero típicamente tiene un límite práctico superior de aproximadamente 30 átomos de carbono. Se ha demostrado que las uniones de cadena de más de aproximadamente 30 átomos de carbono son menos eficaces que los compuestos que tienen uniones de cadena más pequeñas. Por tanto, los conectores de cadena alifática típicamente tienen una longitud de cadena de desde aproximadamente 1 átomo de carbono a aproximadamente 30 átomos de carbono. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que, si un conector particular tiene más de 30 átomos, y todavía funciona eficazmente para unir el hapteno a una unidad de acoplamiento de molécula transportadora, y el conjugado todavía funciona como se desea, entonces dichos enlaces de cadena todavía están dentro del alcance de la presente divulgación.

3. Óxidos de alquileo

Una segunda clase de conectores útiles para practicar la presente divulgación son los óxidos de alquileo. Los óxidos de alquileo se representan en el presente documento por referencia a glicoles, tales como etilenglicoles. Los conjugados de hapteno de la presente divulgación han demostrado ser en particular útiles si la hidrofiliidad del conector se incrementa en relación con sus cadenas de hidrocarburo. Como resultado, los óxidos de alquileo, tales como los glicoles, han demostrado ser útiles para practicar la presente divulgación. Un experto en la técnica apreciará que, a medida que se incrementa el número de átomos de oxígeno, también puede incrementar la hidrofilia del compuesto. Por tanto, los conectores de la presente divulgación tienen en general una fórmula de $(-OCH_2CH_2O-)_n$ donde n es de aproximadamente 2 a aproximadamente 25, pero más típicamente n es de aproximadamente 2 a aproximadamente 12.

Los conectores de polialquilenglicol heterobifuncionales útiles para practicar determinados aspectos divulgados de la presente divulgación se describen en solicitudes pendientes de trámite del cesionario, incluyendo "Nanoparticle Conjugates", solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/413.778, presentada el 28 de abril de 2006; "Antibody Conjugates", solicitud de EE. UU. n.º 11/413.415, presentada el 27 de abril de 2006; y "Molecular Conjugate" solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 60/739.794, presentada el 23 de noviembre de 2005. Un experto en la técnica apreciará que los conectores divulgados en estas solicitudes se pueden usar para unir restos de unión específica, restos generadores de señal y haptenos en cualquiera y todas las combinaciones deseadas. Los conectores de polialquilenglicol heterobifuncionales se divulgan a continuación, y su uso se ejemplifica por referencia al acoplamiento de restos de unión específica, tales como anticuerpos, a haptenos y marcadores detectables. En particular, los conjugados de anticuerpos antihapteno y marcadores detectables y conjugados de anticuerpos primarios con haptenos se ejemplifican en el presente documento.

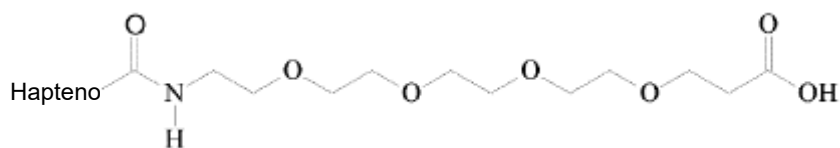
Un aspecto particular de la presente divulgación de un conector para su uso con conjugados divulgados es un conector de polialquilenglicol heterobifuncional que tiene la estructura general mostrada a continuación:



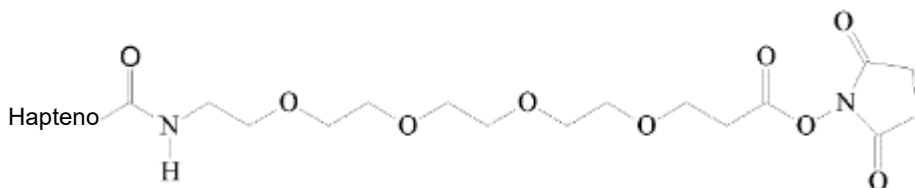
en la que A y B incluyen diferentes grupos reactivos, x es un número entero de 2 a 10 (tal como 2, 3 o 4), e y es un número entero de 1 a 50, para un aspecto de la divulgación, de 2 a 30 tal como de 3 a 20 o de 4 a 12. Uno o más átomos de hidrógeno se pueden sustituir por grupos funcionales adicionales tales como grupos hidroxilo, grupos alcoxi (tales como metoxi y etoxi), grupos halógeno (F, Cl, Br, I), grupos sulfato y grupos amino (incluyendo grupos amino mono y disustituidos tales como grupos dialquilamino).

A y B del conector pueden incluir independientemente un grupo reactivo de carbonilo, un grupo reactivo de amina, un grupo reactivo de hidracina, un grupo reactivo de hidracida, un grupo reactivo de tiol o un grupo fotorreactivo. A y B pueden ser el mismo grupo, o pueden ser grupos diferentes. Las divulgaciones de grupos reactivos de carbonilo incluyen grupos reactivos de aldehído y cetona como derivados de hidracina y aminas. Las divulgaciones de grupos reactivos de amina incluyen ésteres activos tales como NHS o sulfo-NHS, isotiocianatos, isocianatos, acil-acidas, cloruros de sulfonilo, aldehídos, glioxales, epóxidos, oxiranos, carbonatos, haluros de arilo, imidoésteres, anhídridos y similares.

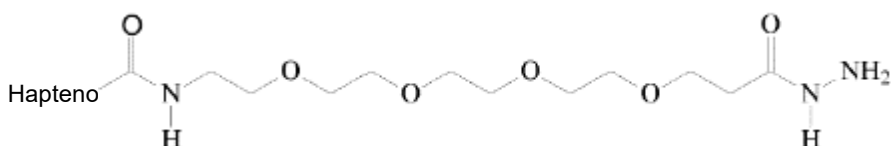
Se han formado conjugados hapteno-conector usando conectores basados en PEG. Una divulgación de un compuesto de este tipo se muestra a continuación.



Este aspecto de la divulgación cumple por lo tanto la fórmula hapteno-L-RG donde L es un dPEG₄ (4 oxígenos de éter) y el grupo reactivo es un grupo funcional ácido carboxílico. El grupo funcional ácido carboxílico se ha convertido en otros grupos funcionales reactivos en aspectos de trabajo de la presente divulgación. Para un aspecto de la divulgación, el grupo funcional ácido carboxílico se puede convertir en un éster activado, tal como un éster NHS, como se muestra a continuación.



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



F. Materiales diversos para el acoplamiento a transportadores poliméricos

Los transportadores poliméricos tienen varios grupos funcionales a través de los que los compuestos o grupos funcionales deseados se pueden incorporar en conjugados. Para un aspecto de la divulgación, determinados aspectos divulgados de la presente divulgación se refieren a conjugados por los que una porción de grupos funcionales reactivos disponibles, tales como grupos funcionales que portan nitrógeno que tienen heteroátomos adyacentes, para el acoplamiento a un hapteno o haptenos, o conectores de hapteno, dejando una porción restante de grupos funcionales reactivos disponibles para reaccionar con una segunda clase de molécula deseada. A modo de divulgación, y sin limitación, la segunda clase de compuestos incluye: moléculas biológicas (incluyendo péptidos, proteínas, enzimas, glúcidos, polisacáridos, lípidos, glucoproteínas y lipoproteínas); marcadores detectables (conectores que tienen un primer extremo acoplado al material polimérico y un segundo acoplado a, o disponible para el acoplamiento a una molécula deseada).

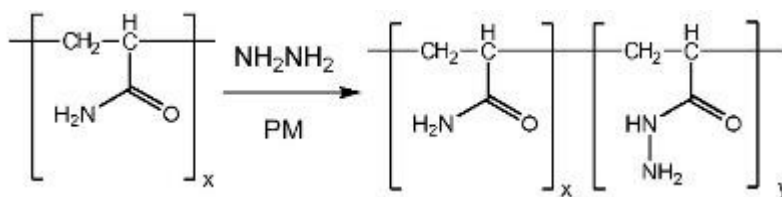
V. Síntesis

A. General

La síntesis detallada de poliacrilamida-hidracida se describe en la solicitud de patente EE. UU. n.º 11/018.897 y se proporciona a continuación en el ejemplo ilustrativo 1. En resumen, una mezcla acuosa de poliacrilamida, disponible comercialmente de Sigma Aldrich, y monohidrato de hidracina (Sigma Aldrich) se somete a calentamiento por microondas. Esta síntesis se indica en general a continuación en el esquema 1.

Esquema 1

Síntesis de poliacrilamida-hidracida

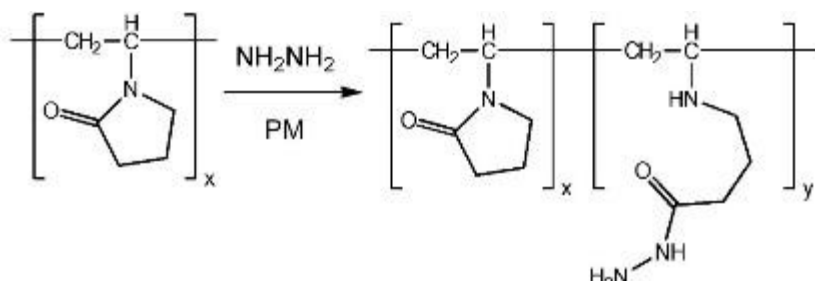


Se purifica la mezcla de reacción por precipitación y aislamiento de la poliacrilamida-hidracida deseada.

El esquema 2 ilustra un modo de realización de una síntesis mediada por microondas de polivinilpirrolidona-hidracida.

Esquema 2

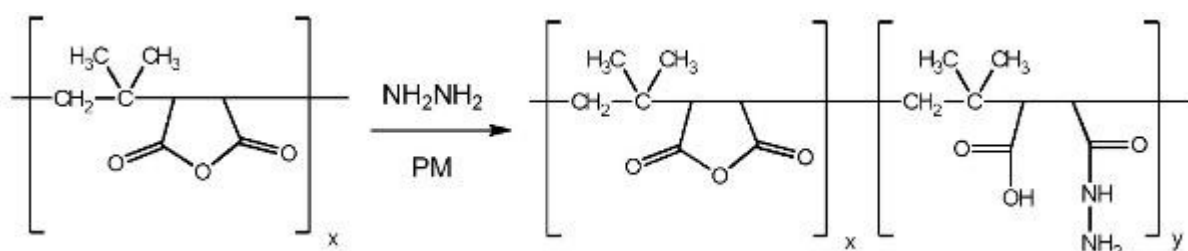
5 Síntesis de polivinilpirrolidona



El esquema 3 ilustra una divulgación de una síntesis mediada por microondas de poli(isobutileno-co-maleico)-hidracida (PIBMH).

Esquema 3

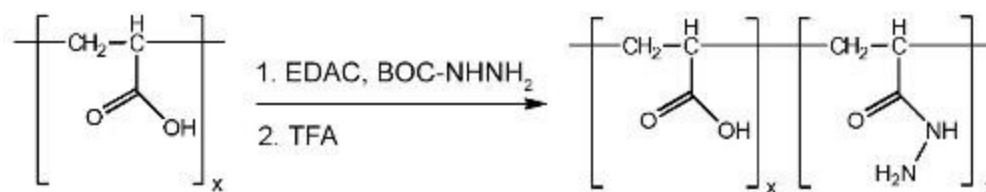
15 Poli(isobutileno-co-maleico)-hidracida



El esquema 4 ilustra una divulgación de una síntesis de poli(ácido acrílico)-hidracida. La síntesis mediada por microondas del polímero poli(ácido acrílico)-hidracida da lugar a poco o ningún producto. Sin estar limitado por una teoría de funcionamiento, puede ser que la hidracina no reaccione, o no reaccione bien, con los grupos funcionales ácidos libres del poli(ácido acrílico), mientras que la hidracina sí reacciona con los grupos funcionales anhídrido de ácido y amida, como se ilustra anteriormente. Como resultado, un aspecto de la presente divulgación de una síntesis exitosa es activar los grupos funcionales ácido carboxílico, seguido de la reacción con una hidracina protegida, tal como una hidracina protegida con BOC. Un experto en la técnica apreciará que los grupos funcionales ácidos se pueden activar para la reacción con un nucleófilo, tal como hidracina u otro grupo funcional reactivo, en una variedad de formas. Sin embargo, el aspecto de trabajo ilustrado de la presente divulgación usó 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDAC) para activar los grupos funcionales ácido carboxílico para la sustitución con una hidracina protegida con BOC. Se retiró el grupo protector BOC con ácido trifluoroacético (TFA) para producir el polímero poli(ácido acrílico)-hidracida.

Esquema 4

Síntesis de poli(ácido acrílico)



B. Síntesis de conjugado usando hidracida polimérica como síntesis ejemplar

Aunque la presente divulgación se puede practicar usando diversos transportadores polímeros, el siguiente análisis ejemplifica la divulgación con referencia a la poliacrilamida-hidracida como transportador polimérico. La poliacrilamida-hidracida se acopla a una molécula de unión específica, tal como un anticuerpo, como se ilustra en la FIG. 2. Para compuestos que incluyen un resto reactivo de hidracida, entonces no es necesaria la activación del compuesto. De

forma alternativa y cuando sea necesario o deseable, el anticuerpo se puede activar para acoplarse a un transportador polimérico. Para un aspecto de la divulgación, una técnica de activación implica proporcionar o producir un grupo funcional reactivo de hidracida en el anticuerpo. Un aspecto en particular útil de la presente divulgación es acoplar el transportador polimérico, tal como un transportador de hapteno polimérico, a la porción Fc de un anticuerpo. Para garantizar que se produce esta reacción, los aspectos de trabajo de la presente divulgación típicamente tienen porciones de carbohidratos oxidados asociados con la porción Fc del anticuerpo para crear un grupo funcional reactivo de hidracida, típicamente un compuesto que porta un carbonilo, tal como un aldehído, o cetona, ácido o éster reactivo, más típicamente un aldehído, usando un agente oxidante apropiado, tal como peryodato. Para los aspectos de trabajo de la presente divulgación, se usó peryodato de sodio en exceso para oxidar proteínas.

Para el aspecto de la presente divulgación ilustrada en la FIG. 2, se forma una hidrazona intermedia acoplando un transportador polimérico a un aldehído formado en la porción Fc del anticuerpo. Los aspectos de trabajo de la presente divulgación redujeron esta hidrazona intermedia usando un reactivo apropiado, tal como cianoborohidruro de sodio. Sin embargo, puede que no se requiera reducción de la hidrazona intermedia. Los aspectos de trabajo de la presente divulgación redujeron la hidrazona intermedia para proporcionar una estabilidad incrementada, tal como eliminando la posibilidad de una reacción retro-Mannich de la base de Mannich. Como otro aspecto de la divulgación, las hidrazonas intermedias pueden ser reactivas con otros componentes, intra o bien intermolecularmente, para producir compuestos menos deseables, tales como heterociclos estables.

La FIG. 2 ilustra que los compuestos resultantes tienen varios grupos funcionales hidracida, es decir, "y", que están disponibles para reacción con otro compuesto deseado. Este aspecto de la presente divulgación se ilustra en la FIG. 2, que ilustra el principio con referencia particular al acoplamiento de haptenos al transportador polimérico. Como con el anticuerpo, puede que no se necesite que los haptenos que pueden reaccionar directamente con el anticuerpo se activen antes de dicho acoplamiento. De forma alternativa, se puede usar un conector para acoplar el conjugado anticuerpo-transportador polimérico a un hapteno, o haptenos, para formar un conjugado anticuerpo-transportador de hapteno polimérico si la activación es deseable o requerida, y/o si algún otro motivo favorece el uso de un conector, tal como separar el hapteno del anticuerpo por motivos estéricos o para facilitar el reconocimiento del/de los hapteno(s) colgante(s). Se puede encontrar información adicional sobre composiciones y usos de conectores en las patentes y/o solicitudes del cesionario que se mencionan en el presente documento.

La FIG. 2 ilustra el uso de diversos conectores, tales como los conectores dPEG₄ a dPEG₂₄, y conectores alquilo, tales como -C₅H₁₁, para acoplar DNP, biotina y fluoresceína, respectivamente, a grupos funcionales hidracida del conjugado anticuerpo-transportador polimérico. Para facilitar el acoplamiento del conjugado anticuerpo-transportador polimérico al conector-hapteno, el conector incluye un éster activado, ilustrándose un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) en la FIG. 1. El conjugado anticuerpo-transportador polimérico se acopla al hapteno para formar un conjugado transportador de hapteno polimérico.

La FIG. 2 ilustra que todos los grupos "y" disponibles, es decir, grupos funcionales que comprenden grupos funcionales hidracida libres, reaccionan con el conector-hapteno activado. Un experto en la técnica apreciará que solo puede reaccionar una porción de los grupos funcionales reactivos disponibles, tal como usando una cantidad estequiométricamente limitada del conector-hapteno. Estos compuestos tendrían grupos funcionales reactivos adicionales disponibles para reaccionar con, para un aspecto de la divulgación, un hapteno o hapteno-conector diferente.

La FIG. 2 ilustra en primer lugar la reacción del transportador polimérico con un anticuerpo para formar un conjugado anticuerpo-transportador polimérico, y a continuación el acoplamiento de un hapteno, haptenos, hapteno-conector, haptenos-conector, hapteno-conectores y/o haptenos-conectores (denominados conjuntamente hapteno/hapteno-conector), al conjugado anticuerpo-transportador polimérico. Un experto en la técnica apreciará que los mismos compuestos se pueden formar opcionalmente en primer lugar acoplando un transportador polimérico a un hapteno/hapteno-conector para formar un transportador de hapteno polimérico. El transportador de hapteno polimérico, que tiene grupos funcionales reactivos disponibles restantes, se acopla a continuación con el anticuerpo, preferentemente solo en la porción Fc del anticuerpo, para formar un conjugado anticuerpo-transportador de hapteno polimérico.

VI. Divulgaciones ejemplares de un procedimiento para el uso de conjugados de transportador de hapteno polimérico divulgados, y composiciones de los mismos

Determinados aspectos ejemplares de la presente divulgación se refieren a técnicas de hibridación *in situ* que se pueden implementar con diversos aspectos de conjugados de transportador de hapteno polimérico divulgados. Se selecciona una muestra que tiene una diana, tal como una proteína. También se selecciona una sonda útil para detectar la diana, tal como un anticuerpo. Se conjugua al menos un transportador de hapteno polimérico con la sonda. Se trata la diana con la sonda conjugada con el transportador de hapteno polimérico de manera eficaz para formar un complejo que se puede visualizar usando cualquier medio adecuado, tal como tratando la diana complejada con el conjugado sonda-transportador de hapteno polimérico con un anticuerpo antihapteno que tiene un marcador detectable, tal como una enzima, un cromóforo orgánico, tal como un fluoróforo, nanopartículas cromóforas, tales como puntos cuánticos fluorescentes, etc., adecuados para visualizar el complejo resultante. Para un aspecto de la

divulgación, si el marcador detectable es una enzima, se proporciona un sustrato para la enzima, produciendo de este modo un precipitado identificable de forma única, tal como un precipitado coloreado.

Se puede acoplar un anticuerpo a un marcador detectable, tal como una enzima. Se añade un sustrato enzimático para producir un producto enzimático detectable. Una divulgación específica de este procedimiento es la hibridación *in situ* con plata (SISH). Una enzima adecuada para SISH es la peroxidasa de rábano picante, que se puede usar en combinación con hidroquinona, iones de plata (por ejemplo, Ag^{+1}) y peróxido de hidrógeno. El producto detectable son partículas de plata elementales. Se puede encontrar información adicional sobre dichos procedimientos en Hainfeld, patente de EE. UU. n.º 6.670.113.

Como otro aspecto de la divulgación, la enzima podría ser fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina desencadena la hidrólisis catalítica del fosfato del agente reductor, es decir, fosfato de ácido ascórbico, generando un agente reductor, es decir, ascorbato, que a continuación se puede usar para reducir la plata más uno (Ag^{+1}) a plata nanoscópica metálica. Por tanto, el producto visualmente detectable es plata elemental. Se puede detectar plata por cualquier medio adecuado, incluyendo microscopía de campo claro. Se puede encontrar información adicional sobre el uso de enzimas fosfatasa en Bieniarz *et al.*, solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0265922, titulada "Enzyme-catalyzed Metal Deposition for the Enhanced *in Situ* Detection of Immunohistochemical Epitopes and Nucleic Acid Sequences".

Los aspectos de la presente divulgación divulgados en el presente documento también se pueden usar para implementar la hibridación *in situ* cromogénica. En este procedimiento, se selecciona una enzima, con divulgaciones adecuadas que incluyen las divulgadas en el presente documento o que son conocidas de otro modo por los expertos en la técnica, usándose peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina para ejemplificar aspectos particulares de la presente divulgación. A continuación se selecciona un sustrato adecuado para producir un producto precipitado coloreado que se puede detectar usando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo microscopía de campo claro. El compuesto cromógeno puede ser fluorógeno. Los compuestos fluorógenos adecuados están disponibles comercialmente de diversas fuentes. El sustrato se puede hacer fluorógeno por acción enzimática. Además, también se pueden usar puntos cuánticos para visualizar interacciones inmunohistoquímicas. Típicamente se realiza un seguimiento de sondas fluorescentes y puntos cuánticos usando un microscopio de fluorescencia.

Los aspectos adicionales de un procedimiento divulgado se refieren a un procedimiento de detección directa. Para este procedimiento, se selecciona un anticuerpo primario, incluyendo un anticuerpo monoclonal, tal como anticuerpo IgG monoclonal de ratón, para una diana particular. El anticuerpo primario también incluye típicamente un marcador detectable, como se analiza anteriormente.

De forma alternativa, se puede usar un procedimiento de amplificación. La presente divulgación también se puede usar para pruebas de diagnóstico. Se selecciona una diana. Se añade un anticuerpo primario a la muestra de manera que permita la complejación de la diana y el anticuerpo primario. Se añade un anticuerpo secundario frente al anticuerpo primario a la muestra. El anticuerpo incluye un marcador detectable que se puede usar para identificar, en particular visualmente o por medios visuales, tales como microscopía, la diana complejada usando un sustrato, como se analiza en el presente documento. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo adecuado, incluyendo a modo de divulgación y sin limitación, un anticuerpo anti-IgG de ratón de conejo marcado. Se puede añadir un anticuerpo secundario, incluyendo un anticuerpo de una especie diferente, al anticuerpo primario a la muestra. Para un aspecto de la divulgación, el anticuerpo podría ser un anticuerpo caprino producido contra el anticuerpo primario, tal como anticuerpos anti-IgG de ratón.

Se puede añadir al menos un antianticuerpo adicional que tiene un marcador detectable a la muestra para amplificar la señal producida por la diana detectada. En este procedimiento ejemplar, el anticuerpo podría ser un anticuerpo anti-IgG caprina de conejo marcado. Se puede añadir el anticuerpo simultáneamente con, o posteriormente a, el anticuerpo marcado.

Determinados aspectos de la presente divulgación se facilitan usando anticuerpos monoclonales antihapteno, tales como para cribado de hibridomas. Se selecciona una diana particular, tal como una diana situada en un tejido. Se administra un anticuerpo primario dirigido a la diana de manera eficaz para que el anticuerpo reconozca la diana. El anticuerpo tiene al menos uno, y potencialmente varios, haptenos conjugados con el mismo usando conjugados de transportador de hapteno polimérico de la presente divulgación. Los haptenos conjugados con el anticuerpo primario pueden ser iguales o diferentes. Se trata una muestra de tejido con anticuerpos antihapteno. En este aspecto ejemplar de la presente divulgación, un anticuerpo primario se acopla eficazmente a un anticuerpo antihapteno, tal como se puede proporcionar a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón de hibridoma. Por tanto, para cada hapteno acoplado al anticuerpo primario, habrá un anticuerpo secundario.

A continuación se identifica el complejo formado por el anticuerpo antihapteno, tal como un anticuerpo monoclonal de ratón. Un procedimiento es tratar ahora la composición con un anticuerpo que reconozca el anticuerpo de ratón, tal como un anticuerpo caprino. En este aspecto ejemplar de la presente divulgación, los anticuerpos caprinos se conjugan con un marcador detectable, tal como una enzima, siendo un aspecto de la divulgación las enzimas de peroxidasa de rábano picante (HRP). A continuación se incuba este complejo con un sustrato HRP, como es conocido por los expertos en la técnica, para formar precipitados detectables, por ejemplo, coloreados. Este procedimiento se

puede usar para el cribado, tal como cribado de hibridomas.

Para cribar anticuerpos monoclonales antihapteno, se obtiene una muestra de tejido, tal como tejido de amígdala humana normal. Se puede incluir la muestra en parafina, y si es así, se desparafina la muestra de tejido, tal como usando solución VMSI EZPrep. A continuación se realiza el acondicionamiento celular y la recuperación de antígeno usando VMSI CC1. Se conjuga un anticuerpo policlonal primario, tal como anti-lambda humano (disponible en Dako), con las divulgaciones de transportadores de hapteno poliméricos divulgados en la presente solicitud. La conjugación se produce preferentemente en la región Fc del anticuerpo para reducir la probabilidad de que la unión afecte a la especificidad del anticuerpo. Se aplica una solución que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo primario al tejido durante un período de tiempo eficaz. Para los aspectos de trabajo de la presente divulgación, la concentración eficaz ha sido de aproximadamente 10 µg/ml del anticuerpo primario, y el período de tiempo eficaz ha sido de aproximadamente 60 minutos. A continuación se lava la muestra de tejido. Después de esto, se aplica un posible anticuerpo antihapteno (por ejemplo, KLH-CGT1-1.1+5-27F09-02E01) a la muestra de tejido durante un período de tiempo eficaz, tal como aproximadamente 60 minutos. A continuación se detecta el anticuerpo usando cualquier medio adecuado, tal como la tinción VMSI Omni Map DAB.

Se puede realizar un cribado inmunohistoquímico (IHQ) automatizado de posibles anticuerpos antihapteno usando un VMSI Discovery XT y tejido de amígdala humana incluido en parafina fijado con formol en portaobjetos de vidrio. En primer lugar, las muestras de tejido se someten a desparafinación, recuperación de antígeno, seguido de la adición de un anticuerpo primario unido a un hapteno de interés usando un transportador de hapteno polimérico, el posible anticuerpo antihapteno y un anticuerpo de detección. Se visualiza el anticuerpo de detección usando un reactivo de detección de cromógeno de VMSI. Se criban manualmente los portaobjetos teñidos bajo un microscopio. Se seleccionan las muestras que tienen un patrón de tinción de anticuerpo primario correcto como posibles candidatos antihapteno. Para someter a prueba la selectividad y especificidad, se criban además productos de fusión celular antihapteno candidatos usando anticuerpos primarios conjugados con un hapteno de una clase química diferente.

Los aspectos divulgados de la presente divulgación contemplan el uso de múltiples haptenos diferentes, y anticuerpos de los mismos, para visualizar una diana detectable. Para un aspecto de la divulgación, se pueden usar haptenos de biotina y DNP, y anticuerpos para los mismos, tales como antibiotina y anti-DNP, para la detección de una diana en una muestra, tal como una proteína en tejido.

Los aspectos de la presente divulgación también son útiles para la detección simultánea de múltiples tipos diferentes de dianas, tales como dianas de proteína, en una muestra. Por ejemplo, con referencia a HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), se añade una sonda HER2 marcada con transportador de hapteno polimérico a una muestra de una manera eficaz para permitir que la sonda se compleje con el gen HER2. A continuación se trata el gen complejo con un anticuerpo antihapteno que tiene un marcador detectable 206, tal como un Qdot. Se añade un anticuerpo de proteína anti-HER2, tal como anticuerpo de conejo anti-HER2 4B5, a la muestra de una manera eficaz para permitir el reconocimiento de la proteína HER2. El anticuerpo anti-HER2 puede incluir al menos un transportador de hapteno polimérico, y potencialmente varios haptenos, que pueden ser iguales o diferentes. Con referencia al uso de biotina para ejemplificar el aspecto de la presente divulgación, a continuación se añade un anticuerpo secundario antihapteno a la muestra de una manera eficaz para permitir la complejación del anticuerpo secundario y hapteno(s). El anticuerpo secundario antihapteno incluye un marcador detectable, tal como un Qdot 655. Por tanto, este aspecto de la presente divulgación permite la detección multiplexada de gen y producto génico.

VII. Kits de prueba

Los aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, kits para llevar a cabo diversos aspectos del procedimiento de la divulgación. Las divulgaciones de dichos kits incluyen las útiles para análisis de colesterol, kits de embarazo, kits de diagnóstico de cáncer, etc. Los kits de prueba de la presente divulgación típicamente tienen un conjugado de transportador de hapteno polimérico de acuerdo con la presente divulgación, tal como al menos un conjugado de molécula de unión específica-transportador de hapteno polimérico, incluyendo conjugados anticuerpo-transportador de hapteno polimérico, y un anticuerpo antihapteno, en particular un anticuerpo antihapteno conjugado con un marcador detectable.

Determinados aspectos del kit de la presente divulgación comprenden un anticuerpo conjugado con transportador de hapteno polimérico, seleccionándose el hapteno de oxazoles, pirazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofurazanos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenonas, cumarinas, ciclolignanos y combinaciones de los mismos. Dichos kits también incluyen típicamente un anticuerpo antihapteno conjugado con un marcador detectable.

Además, los aspectos del kit divulgados de la presente divulgación pueden incluir componentes adicionales, incluyendo pero sin limitarse a varios anticuerpos adicionales. Se pueden usar dichos kits, para un aspecto de la divulgación, por un médico o facultativo.

VIII. Aspectos automatizados de la presente divulgación

Un experto en la técnica apreciará que los aspectos del procedimiento divulgado en el presente documento para el

uso de conjugados de hapteno se pueden automatizar. Ventana Medical sistemas, Inc. es el cesionario de varias patentes de los Estados Unidos que divulgan sistemas y procedimientos para realizar análisis automatizados, incluyendo las patentes de EE. UU. n.º 5.650.327, 5.654.200, 6.296.809, 6.352.861, 6.827.901 y 6.943.029, y las solicitudes publicadas de EE. UU. n.º 20030211630 y 20040052685. Se pueden realizar divulgaciones particulares de procedimientos de tinción de hapteno polimérico usando diversos procedimientos automatizados.

Se proporcionan detalles adicionales sobre divulgaciones de trabajo ejemplares en los ejemplos de trabajo.

IX. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características de aspectos de trabajo de la presente divulgación. Un experto en la técnica apreciará que el alcance de la presente divulgación no se limita a las características particulares ejemplificadas por estos ejemplos.

Para todos los ejemplos de trabajo divulgados, todos los productos químicos se compraron a proveedores comerciales y se usaron como se recibieron. Se compraron soluciones de anticuerpo policlonal (anti-IgG de ratón caprino y anti-IgG de conejo caprino) a Bethyl Labs y se usaron como se recibieron. Se sintetizaron poliacrilamida-hidracida y NHS-PEG₄-DNP como se describe previamente. Se calcularon concentraciones de proteína usando los valores de ϵ_{280} de 1,4 ml·mg⁻¹·cm⁻¹ para el anticuerpo. Se pasó agua, obtenida de una fuente de desionización interna, a través de un sistema Milli-Q Biocel para retirar impurezas. Se realizó intercambio de tampón usando columnas PD-10 (GE Biosciences). Se realizó la SEC usando un purificador Akta (GE Biosciences) y los pesos moleculares se refieren a estándares de proteínas. El caudal fue de 1 mililitro/minuto a través de una columna Superdex 200 GL 10/300 (GE Biosciences).

Ejemplo ilustrativo 1

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para preparar poliacrilamida-hidracida, como se divulga originalmente en la solicitud de patente EE. UU. n.º 11/018.897. Se mezcló poliacrilamida (1 mmol, 20 ml, solución al 50 % en peso, Sigma-Aldrich) con agua destilada (10 ml) y monohidrato de hidracina (20 ml, 420 mmol, Sigma-Aldrich) en un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con un condensador. Se sometió a microondas la mezcla de reacción en una unidad CEM Discovery durante 60 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió un volumen igual de metanol a la mezcla de reacción para inducir la precipitación. Se centrifugó la mezcla resultante y se decantó. Se tomó el residuo en agua desionizada (50 ml) y se repitió el procedimiento de precipitación un total de tres veces. Se disolvió el residuo final en agua desionizada y se liofilizó para dar un polvo higroscópico blanco fino.

Ejemplo ilustrativo 2

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un anticuerpo haptenilado específico de Fc, como se ilustra en la FIG. 1. A una solución de anticuerpo policlonal (1,5 ml, 3,0 mg/ml) se le añadió peryodato de sodio (0,5 ml, 10 mg/ml en agua desionizada) para una concentración de peryodato final de 11,7 mM. Se hizo girar la solución de reacción durante dos horas antes de desalar con una columna PD-10 (acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 5,5) para retirar el peryodato sin reaccionar. Se añadió hapteno-dPEG_x-hidracida en un exceso molar de 500 veces al anticuerpo oxidado seguido de cianoborohidruro de sodio (3,14 mg, 50 µmol) y se incubó la reacción durante un período de 18 horas. La cromatografía de exclusión por tamaño (Na₃PO₄ 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5) dio el anticuerpo haptenilado purificado. Se calculó el número de DNP ($\epsilon_{360} = 18.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{280} = 6.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por anticuerpo usando medidas de UV-Vis, mientras que se midió el número de biotina accesible por anticuerpo usando un ensayo HABA disponible de Sigma-Aldrich.

Ejemplo ilustrativo 3

Este ejemplo ilustrativo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado de IgG polihaptenilado como se ilustra en la FIG. 2.

A. Síntesis de Ab PAH específico de Fc

A una solución de anticuerpo policlonal (1,5 ml, 3,0 mg/ml) se le añadió peryodato de sodio (0,5 ml, 10 mg/ml en agua desionizada) para una concentración de peryodato final de 11,7 mM. Se hizo girar la solución de reacción durante dos horas antes de desalar con una columna PD-10 (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5) para retirar el peryodato sin reaccionar. Se añadió conector de poliacrilamida-hidracida en un exceso molar de 50 veces al anticuerpo junto con cianoborohidruro de sodio (3,14 mg, 50 µmol) y se incubó la reacción durante un período de 18 horas. La SEC (acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0) proporcionó el conjugado anticuerpo-PAH purificado.

B. Síntesis del anticuerpo polihaptenilado

A una solución de PAH-IgG (2,0 ml, 0,53 mg/ml) se le añadió NHS-dPEG_x-hapteno (exceso de 50 veces) y se incubó la reacción durante un período de 18 horas. La SEC (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5) dio como resultado

el anticuerpo polihaptenilado purificado. Se calculó el número de haptenos por anticuerpo usando medidas de UV-Vis, mientras que se midió el número de biotina accesible por anticuerpo usando un ensayo HABA disponible de Sigma-Aldrich.

5 Ejemplo ilustrativo 4

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida específico de Fc como se ilustra en general en la FIG. 2. Se incubó una solución de un anticuerpo policlonal (0,8 ml de 1,0 mg/ml) con una solución acuosa 100 mM de peryodato de sodio (0,2 ml) durante dos horas a temperatura ambiente. Se intercambió el tampón de la solución pasando a través de una columna de G-25 (GE Lifesciences, columna PD-10) usando ABS (acetato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5). Se añadió PAH al Ab oxidado usando un exceso molar de 50 veces al Ab y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió cianoborohidruro de sodio (exceso molar de 50) y se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente. Se purificó el PAH-Ab en una columna de exclusión por tamaño usando ABS (acetato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5). Se añadió NHS-dPEG₈-hapteno (exceso molar de 10-100x) y se incubó la reacción durante un período de 18 horas. La SEC (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5) dio como resultado el anticuerpo polihaptenilado purificado. Se calculó el número de haptenos por anticuerpo usando medidas de UV-Vis, mientras que se midió el número de biotina accesible por anticuerpo usando un ensayo HABA disponible de Sigma-Aldrich. El número de haptenos fue menor que los conjugados en el ejemplo 3, pero mayor que en el ejemplo 2.

20 Ejemplo ilustrativo 5

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida marcado con nitropirazol como se ilustra en general en la FIG. 2. Se incubó el conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida purificado en ABS (acetato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5) con un exceso molar de 20 veces de nitropirazol-dPEG₈-NHS durante 18 horas. Se purificó la mezcla por cromatografía de exclusión por tamaño usando PBS (fosfato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) para producir poli-nitropirazol-PAH-Ab. Se determinó el número de nitropirazoles por PAH-Ab por medidas de UV-Vis.

30 Ejemplo ilustrativo 6

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida marcado con benzofurazano como se ilustra en general en la FIG. 2. Se incubó el conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida purificado en ABS (acetato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5) con exceso molar de 20 veces de benzofurazano-dPEG₈-NHS durante 18 horas. Se purificó la mezcla por cromatografía de exclusión por tamaño usando PBS (fosfato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) para producir poli-benzofurazano-PAH-Ab. Se determinó el número de benzofurazanos por PAH-Ab por medidas de UV-Vis.

40 Ejemplo ilustrativo 7

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida marcado con dinitrofenilo como se ilustra en general en la FIG. 2. Se incubó el conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida purificado en ABS (acetato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5) con un exceso molar de 100 veces de dinitrofenilo-dPEG₈-NHS durante 18 horas. Se purificó la mezcla por cromatografía de exclusión por tamaño usando PBS (fosfato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) para producir poli-dinitrofenilo-PAH-Ab. Se determinó el número de dinitrofenilos por PAH-Ab por medidas de UV-Vis.

Ejemplo ilustrativo 8

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida marcado con tiazolsulfonamida como se ilustra en general en la FIG. 2. Se incubó el conjugado anticuerpo-poliacrilamida-hidracida purificado en ABS (acetato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5) con un exceso molar de 20 veces de tiazolsulfonamida-dPEG₈-NHS durante 18 horas. Se purificó la mezcla por cromatografía de exclusión por tamaño usando PBS (fosfato de sodio 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) para producir poli-tiazolsulfonamida-PAH-Ab. Se determinó el número de tiazolsulfonamidas por PAH-Ab por medidas de UV-Vis.

Ejemplo ilustrativo 9

Este ejemplo se refiere a la detección de epítomos tisulares, en particular Ki-67 en amígdala, usando puntos cuánticos para reconocer un anticuerpo secundario conjugado con un polímero polihaptenilado. El siguiente es el procedimiento adaptado del instrumento Ventana Benchmark. Se calentó el tejido recubierto de parafina en el portaobjetos hasta 75 °C durante 4 minutos y se trató dos veces con ajuste de volumen EZPrep (VMSI) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (VMSI) con ajuste de volumen EZPrep. Después de 4 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen EZPrep junto con cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido a 76 °C durante 4 minutos. Se enfrió el portaobjetos hasta 40 °C y se aclaró tres veces antes de la adición de un anticuerpo anti-Ki67 de ratón (100 µl, VMSI) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 40 °C durante 16 minutos. Después

de aclarar el portaobjetos, se trató el tejido con un anticuerpo biotinilado anti-PAH de ratón caprino (100 µl) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 40 °C durante 8 minutos. Se aclaró el portaobjetos dos veces con tampón seguido de la aplicación de cubreobjetos líquido y la adición de 655 nm de conjugado QDot-SA (100 µl, 20 nmol) e incubación a 37 °C durante 16 minutos. Se aclaró el portaobjetos tres veces con tampón y se trató con un lavado con detergente antes de la aplicación manual de un cubreobjetos en el portaobjetos, después de esto se vio el portaobjetos a través de un microscopio. Las FIGS. 3-6 ilustran resultados de tinción obtenidos de acuerdo con este ejemplo, ilustrando las FIGS. 5 y 6 resultados de tinción obtenidos usando una dilución de 10 veces del anticuerpo primario.

Ejemplo ilustrativo 10

Este ejemplo ilustra la evaluación de anti-lambda en amígdala usando puntos cuánticos conjugados directamente con anticuerpos antihapteno secundarios como se ilustra en general en la FIG. 7. El procedimiento es una adaptación del protocolo de tinción automatizado del instrumento Ventana Benchmark. Se calentó el tejido recubierto de parafina en el portaobjetos hasta 75 °C durante 8 minutos y se trató dos veces con EZPrep, se ajustó el volumen (VMSI) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (VMSI). Después de dos tiempos de incubación de 8 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se ajustó el volumen de EZPrep, seguido de cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido. Se enfrió el portaobjetos hasta 37 °C, se incubó durante 2 minutos y se aclaró una vez con tampón de reacción. A continuación se trató el portaobjetos con acondicionador celular dos veces, seguido de cubreobjetos líquido. Se calienta el portaobjetos hasta 95 °C durante 8 minutos, seguido de cubreobjetos, a continuación se calienta hasta 100 °C durante 4 minutos, seguido de cubreobjetos. "Aplicar acondicionador celular, incubar durante 4 minutos, aplicar cubreobjetos", se repitió este procedimiento de incubación con acondicionador celular 9 veces a 100 °C. Se enfrió el portaobjetos durante 8 minutos, se aclaró con tampón de reacción, se ajustó el volumen, seguido de cubreobjetos líquido. Se calienta el portaobjetos hasta 37 °C durante 2 minutos y se aclara dos veces antes de la adición del conjugado primario (anti-Lambda-PAH-dPEG₈-hapteno, 100 µl, VMSI) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 37 °C durante 32 minutos. Se aclaró el portaobjetos dos veces con tampón de reacción seguido de la aplicación de cubreobjetos líquido y la adición del conjugado punto cuántico-Ab antihapteno apropiado (100 µl, 20-50 nmol) y se incubó a 37 °C durante 32 minutos. Se aclaró el portaobjetos dos veces con tampón seguido de cubreobjetos líquido. Se retira el portaobjetos del instrumento y se trata con un lavado de detergente antes de la aplicación manual de un cubreobjetos. Se capturó la imagen del portaobjetos usando una cámara de obtención de imágenes CRI en un microscopio fluorescente con un filtro de paso largo y un programa informático de potenciación de imagen (Acquity). Las FIGS. 8-11 ilustran resultados de tinción obtenidos de acuerdo con este ejemplo.

Ejemplo ilustrativo 11

Este ejemplo se refiere a la evaluación de conjugados multiméricos de fosfatasa alcalina-anticuerpo, en particular VPH en diferentes tejidos usando conjugados Fc-hidracida-dPEG_x-hapteno seguido de detección de AP-IgG como se representa en la FIG. 12. El siguiente es un procedimiento adaptado del instrumento Ventana Benchmark: se calentó el tejido recubierto de parafina en el portaobjetos hasta 75 °C durante 4 minutos y se trató dos veces con ajuste de volumen EZPrep (VMSI) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (VMSI) con ajuste de volumen EZPrep. Después de 4 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen EZPrep junto con cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido a 76 °C durante 4 minutos. Se añadió acondicionador celular n.º 2 (VMSI), se calentó el portaobjetos hasta 90 °C y se incubó durante 8 minutos. Esto se siguió de otra aplicación de acondicionador celular n.º 2 e incubación a 90 °C durante 12 minutos. Se aclaró el portaobjetos con tampón de reacción (VMSI), se enfrió hasta 37 °C y se añadió ISH-proteasa 3 (100 µl, VMSI). Después de una incubación de 4 minutos, se aclaró el portaobjetos tres veces antes de la aplicación de iView+ HybReady (200 µl, VMSI) que se incubó durante 4 minutos. La adición de la sonda VPH HR (200 µl de VMSI) se siguió de una incubación de 4 minutos a 37 °C, 12 minutos a 95 °C y 124 minutos a 52 °C. A continuación se aclaró el portaobjetos dos veces y se calentó hasta 72 °C. Se repitió esta última etapa dos veces más antes de enfriar el portaobjetos hasta 37 °C y añadir iView + anti-DNP (100 µl, VMSI). Se incubó el anticuerpo primario durante 20 minutos y a continuación se aclaró el portaobjetos dos veces antes de la adición manual de la poli(acrilamida-hidracida-anticuerpo secundario biotinilado (anti-IgG de conejo caprino, 100 µl, 10 µg/ml). Se produjo incubación del anticuerpo secundario durante 20 minutos y el portaobjetos dos veces. A continuación se aplicó el anticuerpo antihapteno (100 µl) y se produjo incubación durante otros 20 minutos. Después de dos etapas más de aclarado, se aplicó el conjugado anti-AP de conejo caprino (100 µl, 6 µg/ml) y se incubó durante 8 minutos. Cuatro etapas de aclarado más se siguieron de la aplicación de iView+ Enhancer (100 µl, VMSI), que se siguió de incubación durante 4 minutos y aplicación tanto de iView+ NBT (100 µl, VMSI) como de iView+ BCIP (100 µl, VMSI). A continuación se incubó el portaobjetos durante un período de 24 minutos, se aclaró tres veces y se añadió contratinción NFR (100 µl, VMSI). Después de la incubación con la contratinción durante 4 minutos, se aclaró el portaobjetos tres veces más y se retiró del instrumento. Se trató el portaobjetos con un lavado de detergente antes de la deshidratación con etanol, acetona y xileno y la posterior aplicación de un cubreobjetos en el portaobjetos, después de esto se vio el portaobjetos a través de un microscopio.

Ejemplo ilustrativo 12

Este ejemplo se refiere a la evaluación de conjugados multiméricos anticuerpo-peroxidasa de rábano picante, en particular la evaluación del VPH en diferentes tejidos usando biotina-hidracida conjugada con Fc o poli(acrilamida-hidracida biotinilada para la detección de SISH como se representa en la FIG. 13. El siguiente es un procedimiento

adaptado del instrumento Ventana Benchmark: se calentó el tejido recubierto de parafina en el portaobjetos hasta 75 °C durante 4 minutos y se trató dos veces con ajuste de volumen EZPrep (VMSI) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (VMSI) con ajuste de volumen EZPrep. Después de 4 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen EZPrep junto con cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido a 76 °C durante 4 minutos. Se añadió acondicionador celular n.º 2 (VMSI), se calentó el portaobjetos hasta 90 °C y se incubó durante 8 minutos. Esto se siguió de otra aplicación de acondicionador celular n.º 2 e incubación a 90 °C durante 12 minutos. Se aclaró el portaobjetos con tampón de reacción (VMSI), se enfrió hasta 37 °C y se añadió ISH-proteasa 3 (100 µl, VMSI). Después de una incubación de 4 minutos, se aclaró el portaobjetos tres veces antes de la aplicación de iView+ HybReady (100 µl, VMSI) que se incubó durante 4 minutos. La adición de la sonda VPH HR (200 µl de VMSI) se siguió de una incubación de 4 minutos a 37 °C, 12 minutos a 95 °C y 124 minutos a 52 °C. A continuación se aclaró el portaobjetos dos veces y se calentó hasta 72°C. Se repitió esta última etapa dos veces más antes de enfriar el portaobjetos hasta 37 °C y añadir iView + anti-DNP (100 µl, VMSI). Se incubó el anticuerpo primario durante 20 minutos y a continuación se aclaró el portaobjetos dos veces antes de la adición manual de la poliacrilamida-hidrácida-anticuerpo secundario biotinilado (anti-IgG de conejo caprino, 100 µl, 10 µg/ml). Se produjo incubación del anticuerpo secundario durante 8 minutos y el portaobjetos dos veces. A continuación se aplicó el anticuerpo antibiotina de conejo (100 µl) y se produjo incubación durante otros 20 minutos. Después de dos etapas más de aclarado, se aplicó el multímero HRP (100 µl, 10 µg/ml) y se incubó durante 8 minutos. Cuatro etapas de aclarado más se siguieron de la aplicación del Cromógeno A-SISH (100 µl VMSI) con una incubación de 4 minutos, Cromógeno B-SISH (100 µl, VMSI) con una incubación de 4 minutos, y Cromógeno C-SISH (100 µl, VMSI) con una incubación de 4 minutos. Se aclaró el portaobjetos tres veces y se añadió hematoxilina II (100 µl, VMSI). Después de incubación con la contratinción durante 4 minutos, se aclaró el portaobjetos y se aplicó reactivo de tinción azul (100 µl, VMSI) y se incubó durante 4 minutos. A continuación se aclaró el portaobjetos tres veces más y se retiró del instrumento. Se trató el portaobjetos con un lavado de detergente antes de la deshidratación con etanol, acetona y xileno y la posterior aplicación de un cubreobjetos en el portaobjetos, después de esto se vio el portaobjetos a través de un microscopio. Las FIGS. 14-21 ilustran resultados de tinción obtenidos de acuerdo con este ejemplo.

Ejemplo ilustrativo 13

Este ejemplo ilustra la detección multiplexada de anti-Kappa, CD34, CD45 y Ki-67 en amígdala con puntos cuánticos como se representa en general en la FIG. 22. El procedimiento es una adaptación del protocolo de tinción automatizado del instrumento Ventana Benchmark. Se calentó el tejido recubierto de parafina en el portaobjetos hasta 75 °C durante 8 minutos y se trató dos veces con EZPrep (VMSI), se ajustó el volumen a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (VMSI). Después de dos tiempos de incubación de 8 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se ajustó el volumen de EZPrep, seguido de cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido. Se enfrió el portaobjetos hasta 37 °C, se incubó durante 2 minutos y se aclaró una vez con tampón de reacción. A continuación se trató el portaobjetos con acondicionador celular dos veces, seguido de cubreobjetos líquido. Se calienta el portaobjetos hasta 95 °C durante 8 minutos, seguido de cubreobjetos, a continuación se calienta hasta 100 °C durante 4 minutos, seguido de cubreobjetos. "Aplicar acondicionador celular, incubar durante 4 minutos, aplicar cubreobjetos", se repitió este procedimiento de incubación con acondicionador celular 9 veces a 100 °C. Se enfrió el portaobjetos durante 8 minutos, se aclaró con tampón de reacción, se ajustó el volumen, seguido de cubreobjetos líquido. Se calentó el portaobjetos hasta 37 °C durante 2 minutos y se aclaró dos veces antes de la adición de los conjugados primarios (anti-Kappa-PAH-dPEG₈-dinitrofenilo, -CD34-PAH-dPEG₈-nitropirazol, -CD45-PAH-dPEG₈-tiosulfonamida y Ki-67-PAH-dPEG₈-benzofurano, 100 µl de cada uno, VMSI) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 37 °C durante 32 minutos. Se aclaró el portaobjetos dos veces con tampón de reacción y el cóctel apropiado de conjugados punto cuántico-Ab antihapteno (100 µl cada uno, 20-50 nmol) seguido de la aplicación de cubreobjetos líquido y se incubó a 37 °C durante 32 minutos. Se aclaró el portaobjetos dos veces con tampón seguido de cubreobjetos líquido. Se retira el portaobjetos del instrumento y se trata con un lavado de detergente antes de la aplicación manual de un cubreobjetos. Se capturó la imagen del portaobjetos usando una cámara de obtención de imágenes CRI en un microscopio fluorescente con un filtro de paso largo y un programa informático de potenciación de imagen (Acquity). Las FIGS. 23-26 ilustran resultados de tinción obtenidos de acuerdo con este ejemplo.

Ejemplo ilustrativo 14

Este ejemplo se refiere a la síntesis de dextrano-hidrácida, dextrano-hidrácinas, dextrano-aminas y dextrano-guanidinas. Se disuelven dextrano-aldehídos (Pierce) de PM promedio 10.000, 20.000 o 40.000 que contienen entre 10 a 200 aldehídos en un tampón fosfato de pH 7,0.

Se añaden los correspondientes bis-PEG_x-amina, bis-hidrácida PEG_x-hidrácida, bis-PEG_x-hidrácina o conector que contiene guanidina, por ejemplo, aminoguanidina (Aldrich), como solución tamponada de pH 7,0 en un exceso molar muy grande (100x con contenido de aldehído como reactivo limitante en el transportador de dextrano).

Se agita la reacción a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Se añade un gran exceso (300x del agente reductor, por ejemplo, cianoborohidruro de sodio, Aldrich) como solución acuosa de un embudo de adición, durante un período de 2 horas.

Se agitan durante la noche las soluciones de reacción y a continuación se dializan frente a agua varias veces,

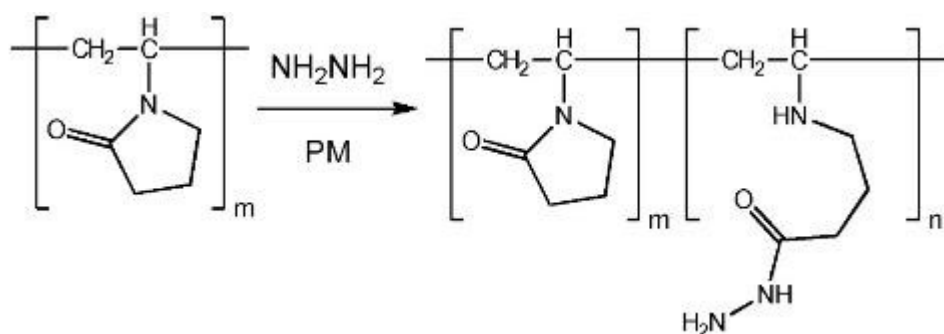
utilizando un tubo de diálisis apropiado que permitirá la difusión de las moléculas de PM más pequeño y reteniendo el gran transportador derivado.

Se liofilizan las soluciones dializadas de los transportadores y se almacenan a 2-8 °C como polvos desecados. El número de aminas, hidracinas, guanidinas o hidracidas se puede cuantificar de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura.

En vista de los muchos aspectos posibles de la presente divulgación a los que se pueden aplicar los principios de la divulgación, se debe reconocer que los aspectos ilustrados de la presente divulgación son solo ejemplos preferentes de la divulgación y no se deben tomar como limitantes del alcance de la divulgación. Más bien, el alcance de la divulgación se define por las siguientes reivindicaciones.

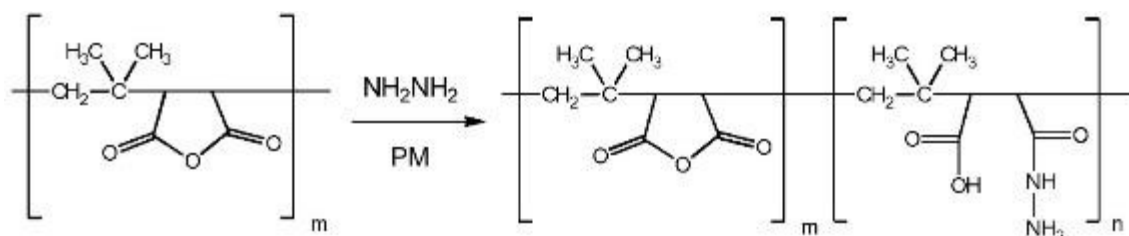
Ejemplo 15

Este ejemplo describe un modo de realización de un procedimiento para preparar polivinilpirrolidona-hidracida (PVPH). Se mezcló polivinilpirrolidona (1 mmol, 20 ml, solución al 50 % en peso, Sigma-Aldrich) con monohidrato de hidracina (50 ml, 1,0 mol, Sigma-Aldrich) en un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con un condensador. Se sometió a microondas la mezcla de reacción en una unidad CEM Discovery durante 60 minutos a 120 °C a diversas potencias (100 W, 200 W, 300 W). Se redujo la reacción al vacío hasta una espuma blanquecina. Se tomó el residuo en una cantidad mínima de agua DI y se mezcló con un volumen grande de tetrahidrofurano (THF) para inducir la precipitación. Se centrifugó la mezcla resultante y se decantó. Se tomó el residuo en una cantidad mínima de agua desionizada y se repitió el procedimiento de precipitación con THF un total de tres veces. Se disolvió el residuo final en agua desionizada y se liofilizó para dar un polvo higroscópico blanquecino fino.



Ejemplo ilustrativo 16

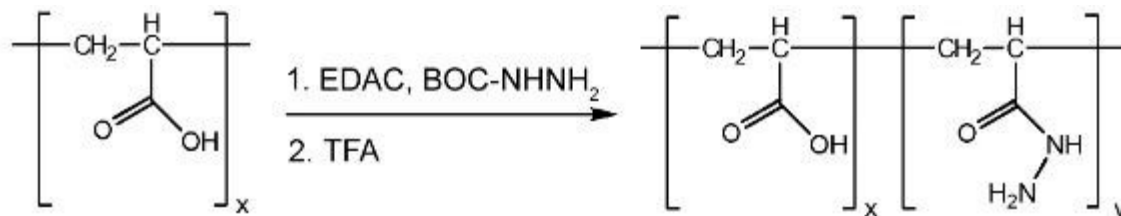
Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para preparar poli(isobutileno-co-maleico)-hidracida (PIBMH). Se mezcló poli(isobutileno-co-anhídrido maleico) (7,1 mmol, 1,09 g, Sigma-Aldrich) con monohidrato de hidracina (7,0 ml, 144 mmol, Sigma-Aldrich) en un tubo de microondas CEM de 10 ml. Se sometió a microondas la mezcla de reacción en una unidad CEM Discovery durante 60 minutos a 120 °C a 300 W. Se redujo la reacción al vacío hasta una espuma blanquecina. Se tomó el residuo en una cantidad mínima de agua DI y se mezcló con un volumen grande de etanol para inducir la precipitación. Se centrifugó la mezcla resultante y se decantó. Se tomó el residuo en una cantidad mínima de agua desionizada y se repitió el procedimiento de precipitación con etanol un total de tres veces. Se disolvió el residuo final en agua desionizada y se liofilizó para dar un polvo higroscópico blanquecino fino.



Ejemplo ilustrativo 17

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para preparar poli(ácido acrílico)-hidracida (PAAH). Se diluyó poli(ácido acrílico) (9,57 mmol, 2,00 g, solución al 45 % en peso en agua, Sigma-Aldrich) con 40 ml de agua DI y se hizo reaccionar con carbazato de t-butilo (9,57 mmol, 1,24 g, Sigma-Aldrich) y EDAC (19,1 mmol, 3,66 g) a temperatura ambiente durante 14 horas. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción hasta <3 por adición gota a gota de HCl 1 M para inducir la precipitación del polímero. Se filtró el precipitado de polímero, se lavó con agua DI y se secó

al vacío para producir 846 mg de material. Se agitó el polímero protegido con BOC en ácido trifluoroacético (8 ml) hasta que se disolvió completamente durante una hora y se retiró el TFA al vacío. Se retiró el TFA residual por destilación azeotrópica con tolueno, seguido de cloruro de metileno, y se secó además a presión reducida para dar 720 mg de un sólido blanco.



Ejemplo ilustrativo 18

Este ejemplo describe el procedimiento para determinar los equivalentes molares de los grupos hidracida reactivos por polímero por fluorescencia. Se generó una curva estándar haciendo reaccionar seis concentraciones (0,1 a 0,8 mM) de acetilhidracida con fluorescamina en PBS, pH 7,5 y representando la fluorescencia (A360/E460) frente a la concentración. El valor de R^2 fue de 0,994 para la curva estándar.

Se usaron poliacrilamida, poli(isobutileno-co-anhídrido maleico), polivinilpirrolidona y poli(ácido acrílico) como controles negativos para la incorporación de hidracida en poliacrilamida-hidracida, polivinilpirrolidona-hidracida, poli(isobutileno-co-maleico)-hidracida y poli(ácido acrílico)-hidracida como se sintetizan a partir de los ejemplos 1, 15, 16 y 17, respectivamente. Se disolvió cada polímero en PBS, pH 7,5 a una concentración conocida, se hizo reaccionar con fluorescamina y se midió la fluorescencia a 460 nm. Se calculó el número de hidracidas reactivas en comparación con la curva estándar y se ajustó para el peso molecular promedio de los polímeros individuales.

La incorporación de hidracida fue la más alta para la poliacrilamida, pero poli(isobutileno-co-anhídrido maleico) y polivinilpirrolidona produjeron polímero funcionalizado. El uso de energía de microondas adicional no pareció incrementar significativamente la funcionalización de hidracida como se muestra en la tabla 2. La incorporación no mediada por microondas de hidracina en poli(ácido acrílico) produjo una incorporación de hidracida mayor que con poli(isobutileno-co-anhídrido maleico) o bien polivinilpirrolidona, pero una incorporación menor que con poliacrilamida.

Tabla 1

Incorporación de hidracida en polímero

Polímero	Equivalentes molares de hidracidas
Poliacrilamida	0,0
Poliacrilamida-hidracida	76
Poli(isobutileno-co-anhídrido maleico)	0,0
Poli(isobutileno-co-maleico)-hidracida	38
Polivinilpirrolidona	4,7
Polivinilpirrolidona-hidracida	30
Poli(ácido acrílico)	0,0
Poli(ácido acrílico)-hidracida	53

Tabla 2

Incorporación de hidracida en polímero por energía de microondas

Polímero	Equivalentes molares de hidracidas
Polivinilpirrolidona	4,7
Polivinilpirrolidona-hidracida (100 W)	33
Polivinilpirrolidona-hidracida (200 W)	34
Polivinilpirrolidona-hidracida (300 W)	30

Ejemplo 19

Este ejemplo describe un modo de realización de un procedimiento para sintetizar un conjugado anticuerpo-

polivinilpirrolidona-hidracida (PVPH-Ab) específico de Fc como se ilustra en general en la FIG. 2. Se incubó una solución de un anticuerpo policlonal (0,8 ml de 1,0 mg/ml) con una solución acuosa 100 mM de peryodato de sodio (0,2 ml) durante dos horas a temperatura ambiente. Se intercambió el tampón de la solución pasando a través de una columna de G-25 (GE Lifesciences, columna PD-10) usando ABS (acetato 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5). Se añadió PVPH al Ab oxidado usando un exceso molar de 50 veces al Ab y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Se purificó el PVPH-Ab en una columna de exclusión por tamaño usando ABS (acetato 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5). Se añadió NHS-dPEG₈-DNP (exceso molar de 50x) y se incubó la reacción durante un período de 18 horas. La SEC (fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5) dio como resultado el anticuerpo polihaptenilado purificado. Se calculó el número de haptenos por anticuerpo usando medidas de UV-Vis.

Ejemplo ilustrativo 20

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado anticuerpo-poli(isobutileno-co-maleico)-hidracida (PIBM-Ab) específico de Fc quimioselectivo como se ilustra en general en la FIG. 2. Se incubó una solución de un anticuerpo policlonal (0,8 ml de 1,0 mg/ml) con una solución acuosa 100 mM de peryodato de sodio (0,2 ml) durante dos horas a temperatura ambiente. Se intercambió el tampón de la solución pasando a través de una columna de G-25 (GE Lifesciences, columna PD-10) usando ABS (acetato 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5). Se añadió PVPH al Ab oxidado usando un exceso molar de 50 veces al Ab y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Se purificó el PIBMH-Ab en una columna de exclusión por tamaño usando ABS (acetato 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5). Se añadió NHS-dPEG₈-DNP (exceso molar de 50x) y se incubó la reacción durante un período de 18 horas. La SEC (fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5) dio como resultado el anticuerpo polihaptenilado purificado. Se calculó el número de haptenos por anticuerpo usando medidas de UV-Vis.

Ejemplo ilustrativo 21

Este ejemplo describe una divulgación de un procedimiento para sintetizar un conjugado anticuerpo-poli(ácido acrílico)-hidracida (PAAH-Ab) específico de Fc quimioselectivo como se ilustra en general en la FIG. 2. Se incubó una solución de un anticuerpo policlonal (0,8 ml de 1,0 mg/ml) con una solución acuosa 100 mM de peryodato de sodio (0,2 ml) durante dos horas a temperatura ambiente. Se intercambió el tampón de la solución pasando a través de una columna de G-25 (GE Lifesciences, columna PD-10) usando ABS (acetato 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5). Se añadió PAAH al Ab oxidado usando un exceso molar de 50 veces al Ab y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Se purificó el PAAH-Ab en una columna de exclusión por tamaño usando ABS (acetato 0,10 M, NaCl 0,15 M, pH 5,5). Se añadió NHS-dPEG₈-DNP (exceso molar de 50x) y se incubó la reacción durante un período de 18 horas. La SEC (fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5) dio como resultado el anticuerpo polihaptenilado purificado. Se calculó el número de haptenos por anticuerpo usando medidas de UV-Vis.

Ejemplo ilustrativo 22

Este ejemplo se refiere a la detección de epítomos tisulares, en particular Ki-67 en amígdala, usando tinción cromogénica (es decir, depósito mediado por HRP de DAB) o bien puntos cuánticos para reconocer un anticuerpo conjugado con un polímero polihaptenilado. El siguiente es el procedimiento adaptado del instrumento Ventana Benchmark. Se calentó el tejido recubierto de parafina en el portaobjetos hasta 75 °C durante 4 minutos y se trató dos veces con ajuste de volumen EZPrep (VMSI) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (VMSI) con ajuste de volumen EZPrep. Después de 4 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen EZPrep junto con cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido a 76 °C durante 4 minutos. Se enfrió el portaobjetos hasta 40 °C y se aclaró tres veces antes de la adición de un anticuerpo anti-Ki67 de ratón (100 µl, VMSI) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 40 °C durante 16 minutos. Después de aclarar el portaobjetos, se trató el tejido con un anticuerpo anti-PVPH-DNP de ratón caprino (100 µl) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 40 °C durante 8 minutos. Se aclaró el portaobjetos dos veces con tampón seguido de la aplicación de cubreobjetos líquido y la adición de 655 nm de conjugado MAb QDot:anti-DNP (100 µl, 20 nmol) e incubación a 37 °C durante 16 minutos. Se aclaró el portaobjetos tres veces con tampón y se trató con un lavado con detergente antes de la aplicación manual de un cubreobjetos en el portaobjetos, después de esto se vio el portaobjetos a través de un microscopio. Las FIGS. 27 y 28 ilustran resultados de tinción obtenidos de acuerdo con este ejemplo.

Ejemplo ilustrativo 23

Este ejemplo se refiere a la detección de epítomos tisulares, en particular Ki-67 en amígdala, usando tinción cromogénica (es decir, depósito mediado por HRP de DAB) o bien puntos cuánticos para reconocer un anticuerpo conjugado con un polímero polihaptenilado. El siguiente es el procedimiento adaptado del instrumento Ventana Benchmark. Se calentó el tejido recubierto de parafina en el portaobjetos hasta 75 °C durante 4 minutos y se trató dos veces con ajuste de volumen EZPrep (VMSI) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (VMSI) con ajuste de volumen EZPrep. Después de 4 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen EZPrep junto con cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido a 76 °C durante 4 minutos. Se enfrió el portaobjetos hasta 40 °C y se aclaró tres veces antes de la adición de un anticuerpo anti-Ki67 de ratón (100 µl, VMSI) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 40 °C durante 16 minutos. Después de aclarar el portaobjetos, se trató el tejido con un anticuerpo anti-PIBMH-DNP de ratón caprino (100 µl) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 40 °C

5 durante 8 minutos. Se aclaró el portaobjetos dos veces con tampón seguido de la aplicación de cubreobjetos líquido y la adición de 655 nm de conjugado MAb QDot:anti-DNP (100 µl, 20 nmol) e incubación a 37 °C durante 16 minutos. Se aclaró el portaobjetos tres veces con tampón y se trató con un lavado con detergente antes de la aplicación manual de un cubreobjetos en el portaobjetos, después de esto se vio el portaobjetos a través de un microscopio. Las FIGS. 29 y 30 ilustran resultados de tinción obtenidos de acuerdo con este ejemplo.

Ejemplo ilustrativo 24

10 Este ejemplo se refiere a la detección de epítomos tisulares, en particular Ki-67 en amígdala, usando tinción cromogénica (es decir, depósito mediado por HRP de DAB) o bien puntos cuánticos para reconocer un anticuerpo conjugado con un polímero polihaptenilado. El siguiente es el procedimiento adaptado del instrumento Ventana Benchmark. Se calentó el tejido recubierto de parafina en el portaobjetos hasta 75 °C durante 4 minutos y se trató dos veces con ajuste de volumen EZPrep (VMSI) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (VMSI) con ajuste de volumen EZPrep. Después de 4 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen EZPrep
 15 junto con cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido a 76 °C durante 4 minutos. Se enfrió el portaobjetos hasta 40 °C y se aclaró tres veces antes de la adición de un anticuerpo anti-Ki67 de ratón (100 µl, VMSI) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 40 °C durante 16 minutos. Después de aclarar el portaobjetos, se trató el tejido con un anticuerpo anti-PAAH-DNP de ratón caprino (100 µl) seguido de cubreobjetos líquido e incubación a 40 °C durante 8 minutos. Se aclaró el portaobjetos dos veces con tampón seguido de la aplicación de cubreobjetos líquido y la adición de 655 nm de conjugado MAb QDot:anti-DNP (100 µl, 20 nmol) e incubación a 37 °C durante 16 minutos. Se aclaró el portaobjetos tres veces con tampón y se trató con un lavado con detergente antes de la aplicación manual de un cubreobjetos en el portaobjetos, después de esto se vio el portaobjetos a través de un microscopio. Las FIGS. 31 y 32 ilustran resultados de tinción obtenidos de acuerdo con este ejemplo.
 20
 25 La presente solicitud se ha descrito con referencia a determinados aspectos particulares de la presente divulgación. Un experto en la técnica apreciará que el alcance de la divulgación no se limita a esos aspectos particulares.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, que comprende un anticuerpo, que tiene una porción Fc oxidada para crear un grupo funcional reactivo hidracida, unido covalentemente a un marcador detectable a través de un grupo funcional reactivo proporcionado por un transportador polimérico, comprendiendo el transportador polimérico una porción polimérica que incluye varios grupos funcionales reactivos seleccionados de hidracinas, hidracidas, derivados de hidracina, derivados de hidracida, guanidinas, aminoguanidinas, hidroxilaminas, o combinaciones de los mismos;
- en el que el marcador detectable es una enzima o un hapteno, o una combinación de los mismos;
- y
- en el que el transportador polimérico se acopla a la porción Fc oxidada del anticuerpo,
- y en el que el transportador polimérico comprende una porción polimérica seleccionada de polivinilpirrolidonas.
2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 donde el transportador polimérico es polivinilpirrolidona-hidracida.
3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 donde el marcador detectable es un hapteno, opcionalmente donde varios haptenos diferentes se acoplan al transportador polimérico, en particular donde el hapteno se acopla al anticuerpo a través de un grupo funcional reactivo del transportador polimérico usando un transportador NHS-PEG, o combinaciones de los mismos, opcionalmente donde el marcador detectable es
 - (a) un hapteno seleccionado de di-nitrofenilo, biotina, digoxigenina, fluoresceína, rodamina, bromodesoxiuridina, inmunoglobulina de ratón, o combinaciones de los mismos; o
 - (b) un hapteno seleccionado de oxazoles, pirazoles, tiazoles, benzofurazanos, triterpenos, ureas, tioureas, nitroarilos distintos de dinitrofenilo, rotenoides, cumarinas, ciclolignanos, heterobiarilos, azoarilos, benzodiazepinas, o combinaciones de los mismos.
4. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un conjugado polihaptenilado.
5. Un procedimiento para formar un conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende:
 - acoplar un anticuerpo que tiene una porción Fc oxidada a un marcador detectable a través de un grupo funcional reactivo seleccionado de hidracinas, hidracidas, derivados de hidracina, derivados de hidracida, guanidinas, aminoguanidinas, hidroxilaminas, o combinaciones de los mismos proporcionado por un transportador polimérico comprendiendo el transportador polimérico una porción polimérica que incluye varios grupos funcionales reactivos; y
 - acoplar el transportador polimérico a la porción Fc oxidada del anticuerpo;
 - en el que el marcador detectable es una enzima o un hapteno, o una combinación de los mismos.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende:
 - (a) formar un primer compuesto acoplando el anticuerpo a al menos una porción de los grupos funcionales reactivos; y
 - acoplar al menos una porción de los grupos funcionales reactivos restantes del primer compuesto al marcador detectable, o
 - (b) formar un primer compuesto acoplando el marcador detectable a al menos una porción de los grupos funcionales reactivos; y
 - acoplar al menos una porción de los grupos funcionales reactivos restantes del primer compuesto al anticuerpo.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende acoplar el transportador polimérico a la porción Fc del anticuerpo a través de los grupos funcionales hidracida reactivos, opcionalmente que comprende además activar el anticuerpo para la reacción con los grupos funcionales reactivos, que comprende opcionalmente además modificar químicamente una porción glucosilada del anticuerpo.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 donde el marcador detectable es un hapteno acoplado al

anticuerpo a través de los grupos funcionales reactivos usando un transportador NHS-PEG.

- 5 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende además hacer reaccionar una tercera molécula con al menos uno de los grupos funcionales reactivos.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende:
oxidar una porción Fc de un anticuerpo para formar una porción Fc oxidada;
10 acoplar el transportador polimérico a la porción Fc oxidada del anticuerpo a través de al menos un grupo funcional hidracida reactivo para formar un primer compuesto; y
acoplar el primer compuesto a al menos un hapteno a través de un grupo funcional hidracida reactivo para formar un segundo compuesto, opcionalmente donde el hapteno se acopla al anticuerpo a través de grupos
15 funcionales hidracida reactivos usando un transportador NHS-PEG,
opcionalmente acoplar el primer compuesto a varios haptenos, en particular varios haptenos diferentes.
- 20 11. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico para una diana en una muestra, que comprende:
poner en contacto la muestra con un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo se une específicamente a una diana; y
25 detectar el anticuerpo unido a la diana usando el marcador detectable,
en particular donde el marcador detectable es un hapteno y el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra con un anticuerpo antihapteno, opcionalmente que comprende además poner en contacto la muestra con un anticuerpo antianticuerpo.
- 30 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 donde el ensayo es un ensayo de diagnóstico multiplexado para dos o más dianas diferentes en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
poner en contacto la muestra con dos o más anticuerpos que se unen específicamente a dos o más dianas diferentes, donde los dos o más anticuerpos se conjugan con diferentes haptenos a través de grupos
35 funcionales reactivos del transportador polimérico; y
poner en contacto la muestra con dos o más anticuerpos antihapteno diferentes que se pueden detectar por separado.
- 40 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 donde el procedimiento comprende:
poner en contacto la muestra con dos o más anticuerpos primarios, conjugándose cada uno de los anticuerpos primarios con diferentes haptenos; y
45 poner en contacto la muestra con dos o más anticuerpos antihapteno secundarios, conjugándose cada uno de los anticuerpos antihapteno secundarios con diferentes puntos cuánticos.

FIG. 1

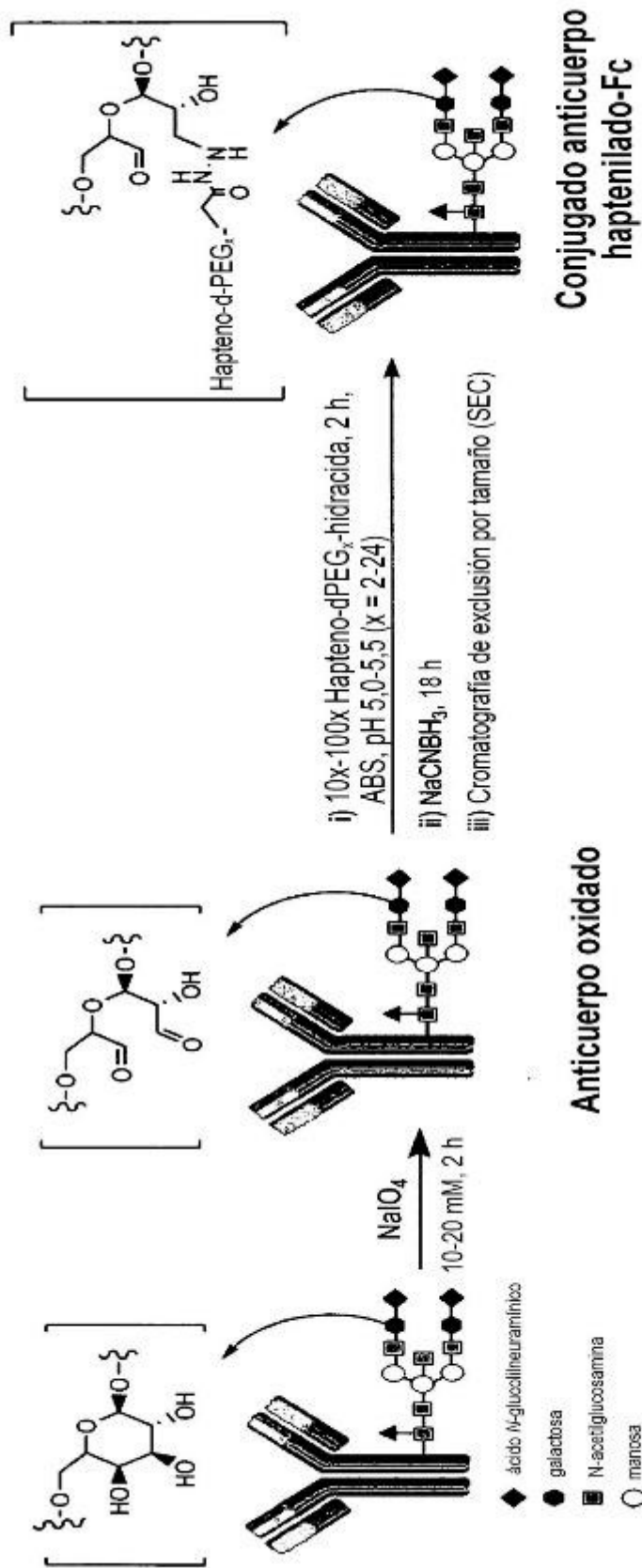


FIG. 2

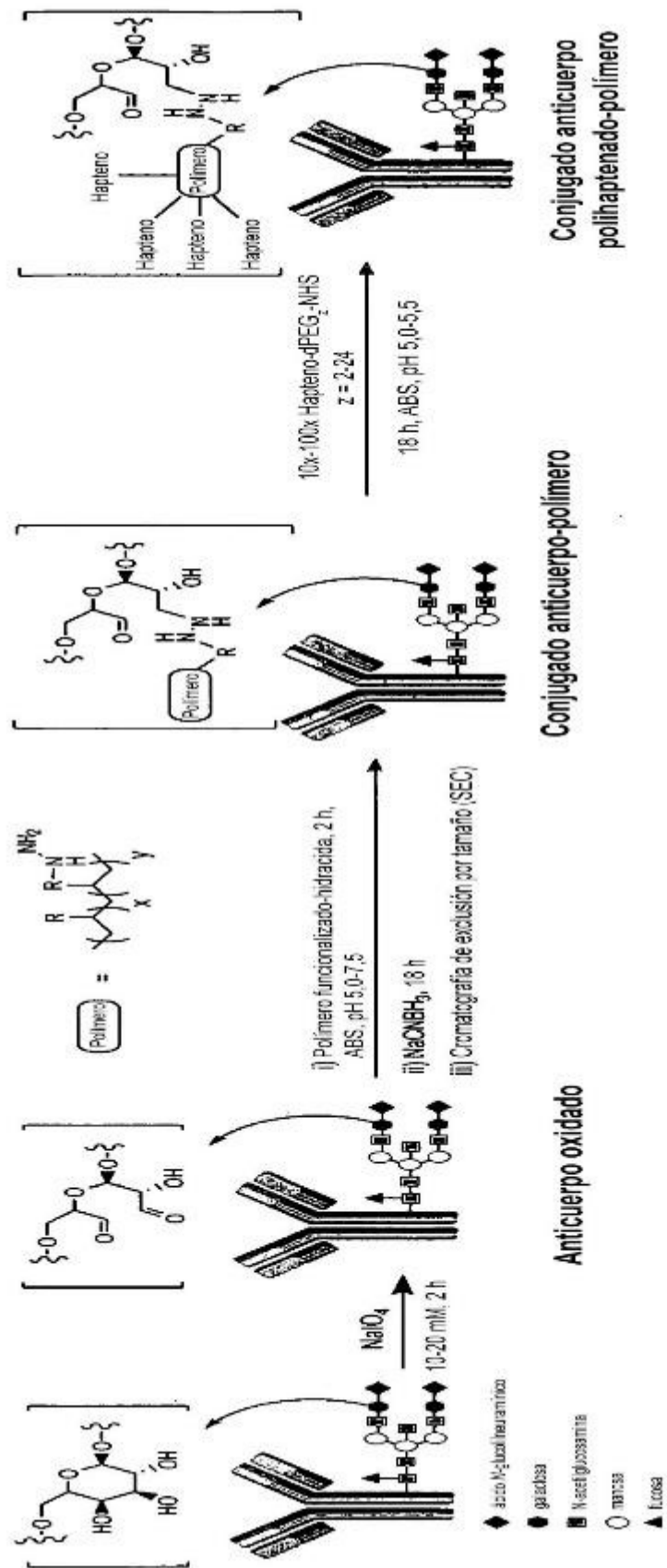


FIG. 3

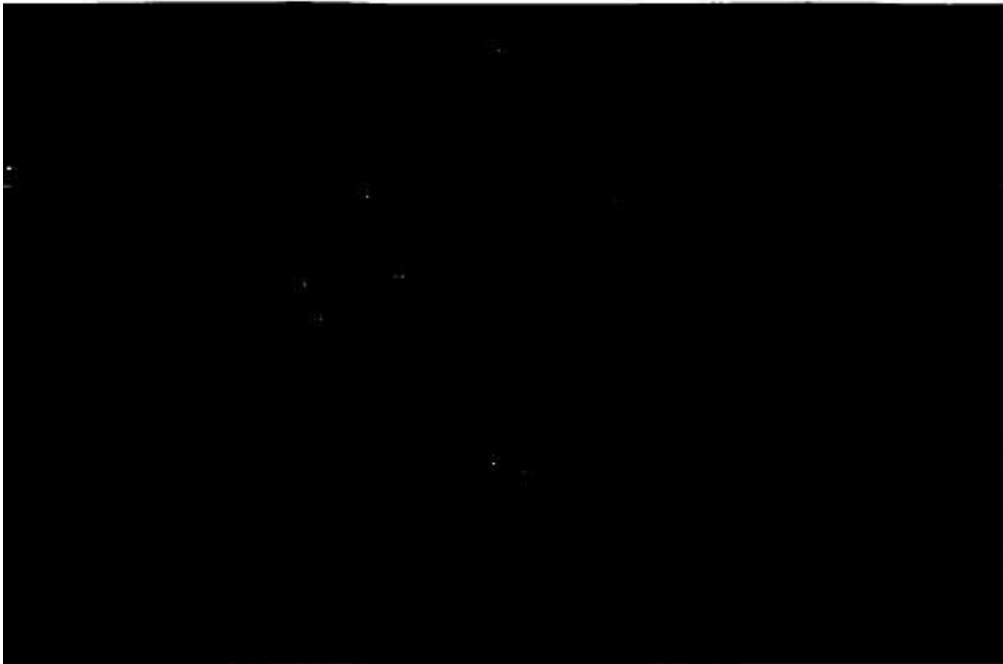


FIG. 4



FIG. 5

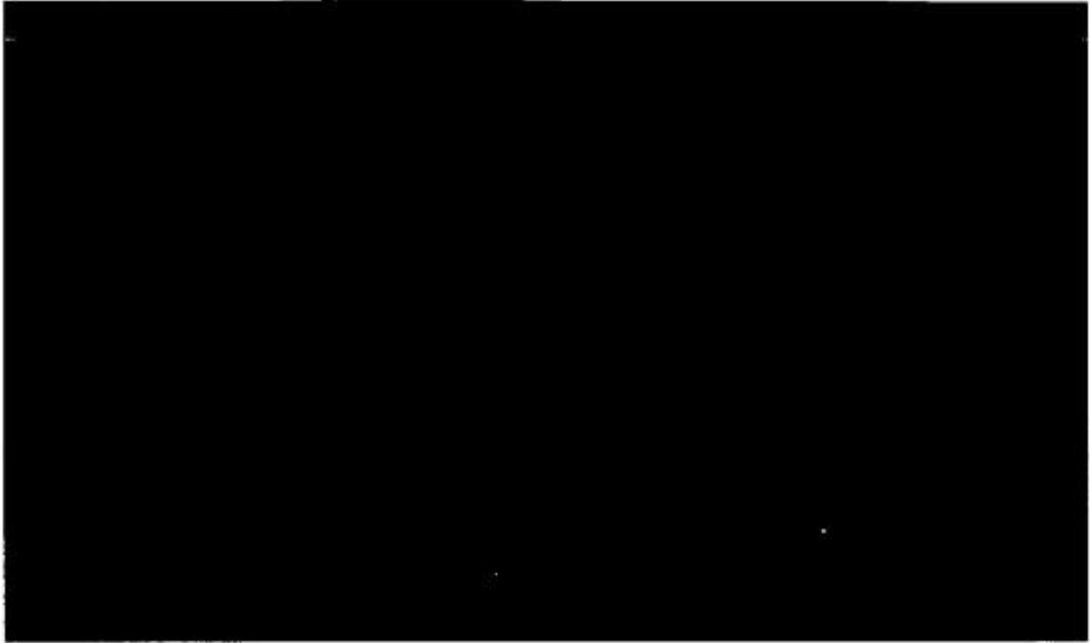


FIG. 6

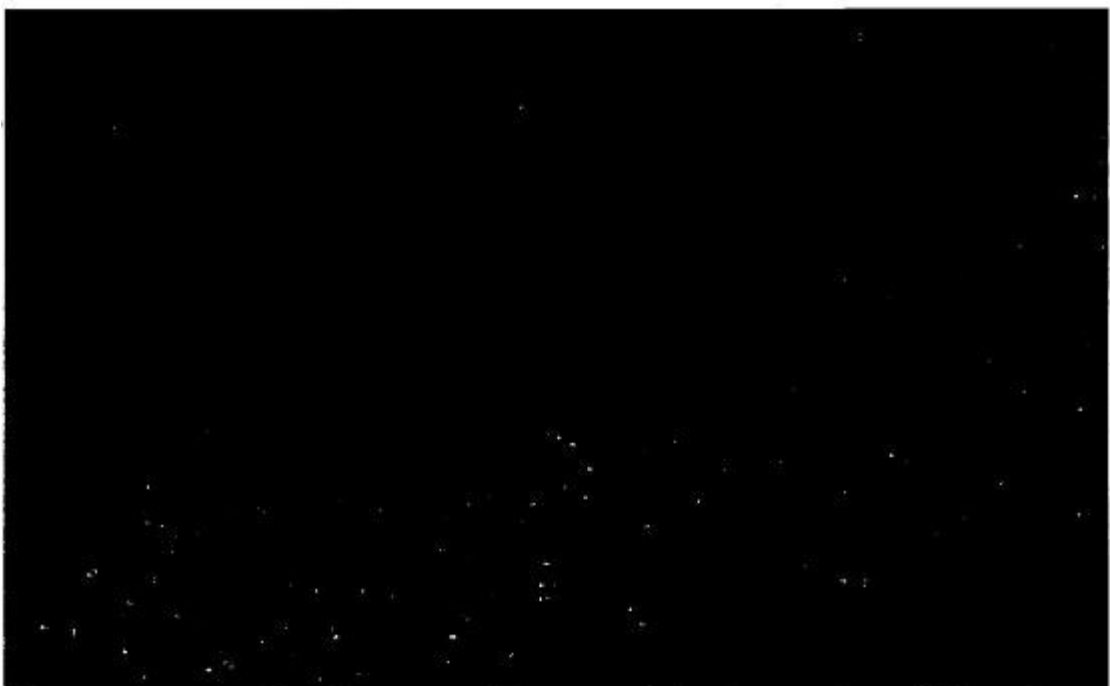


FIG. 7

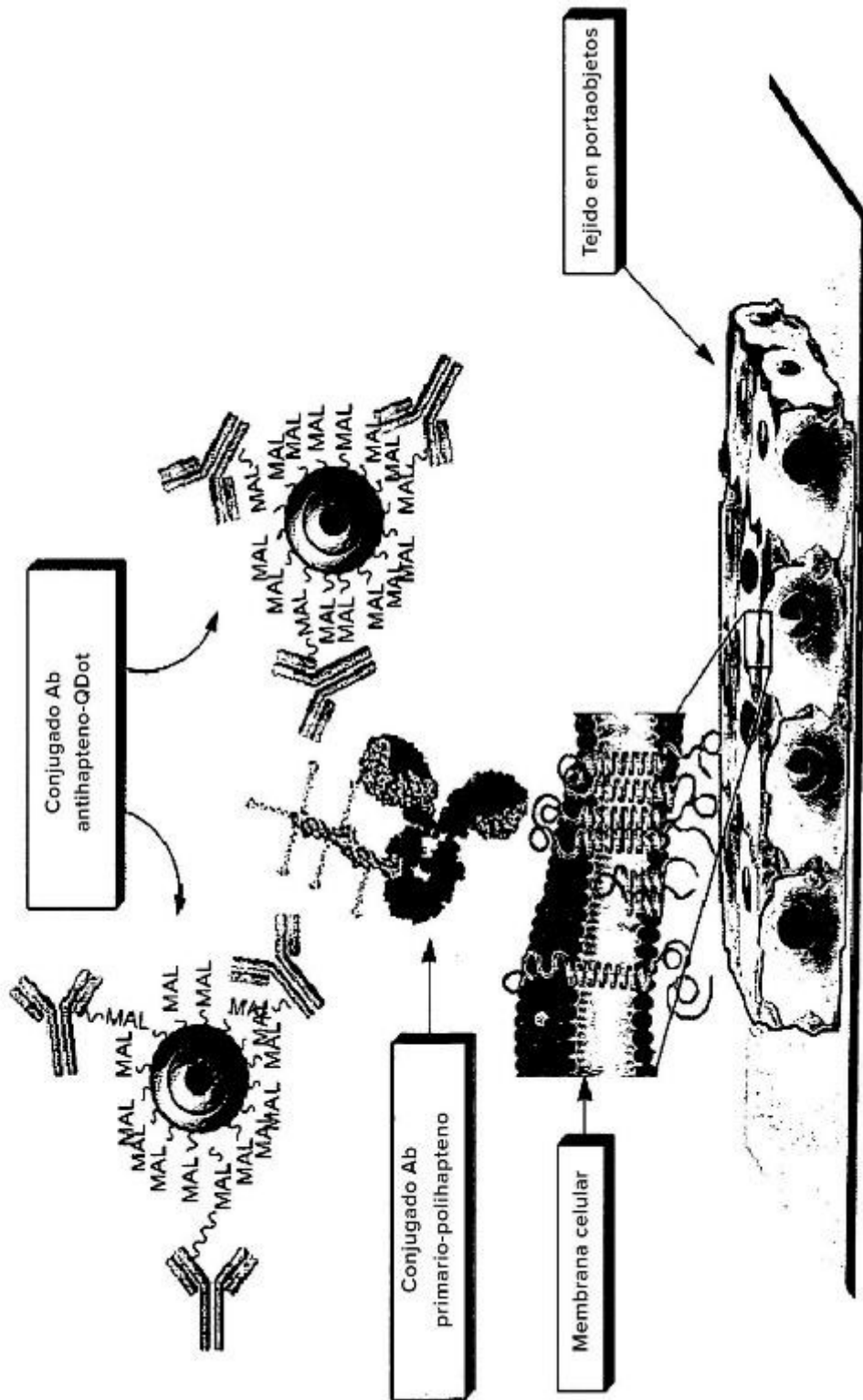


FIG. 8

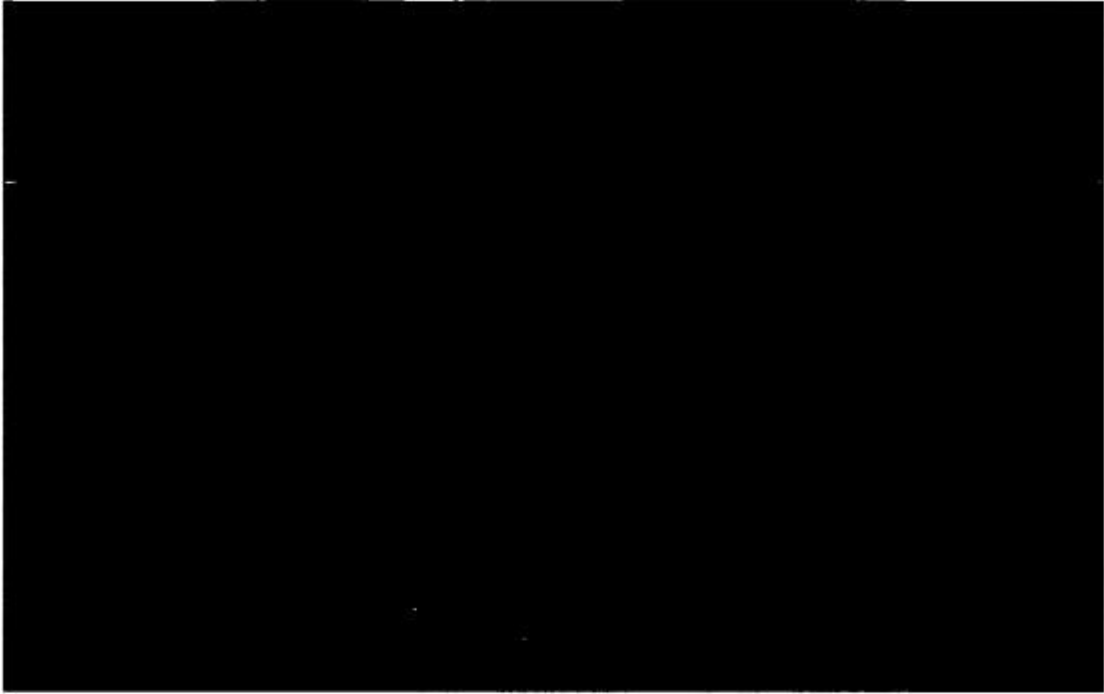


FIG. 9



FIG. 10

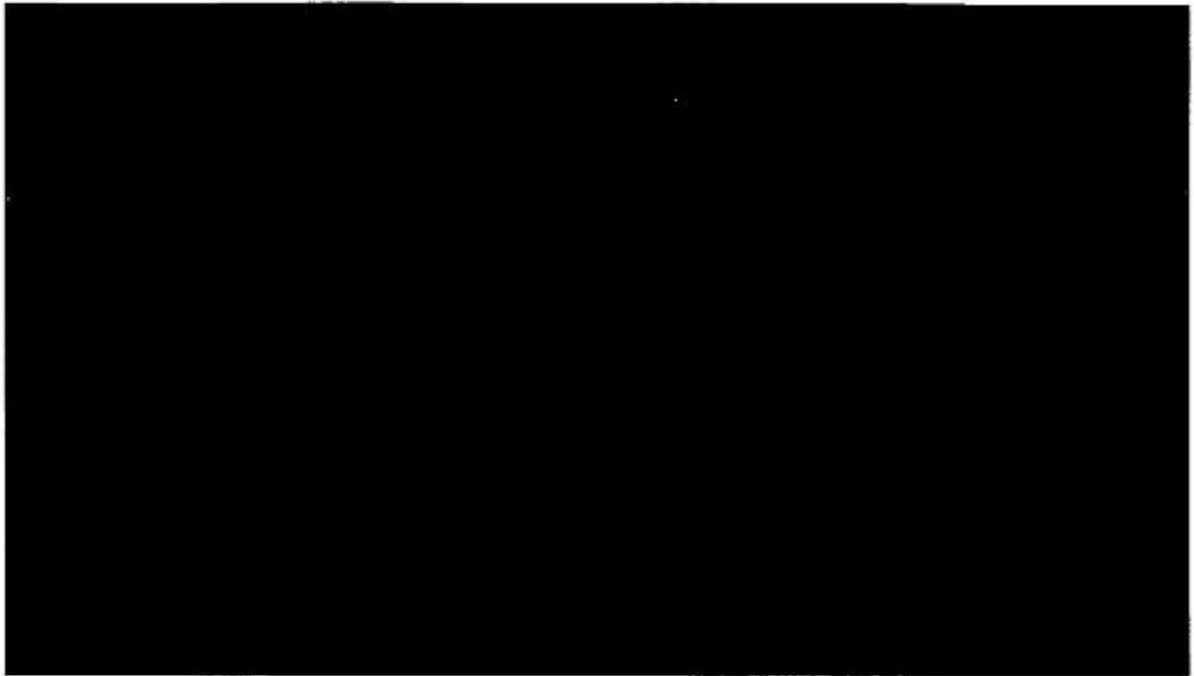


FIG. 11



FIG. 12

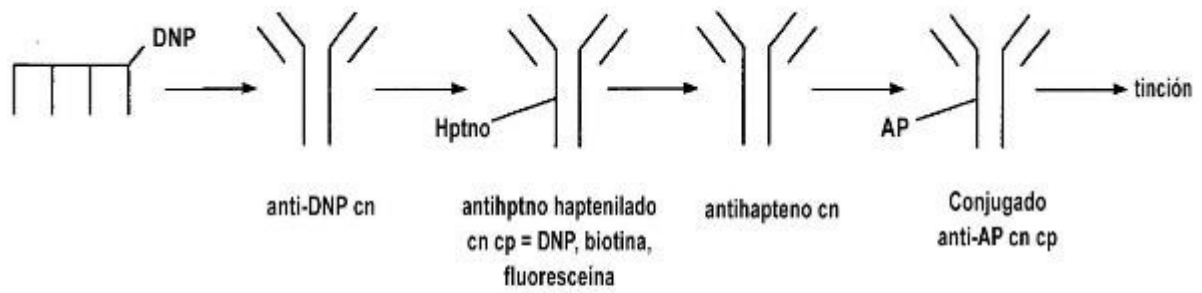


FIG. 13

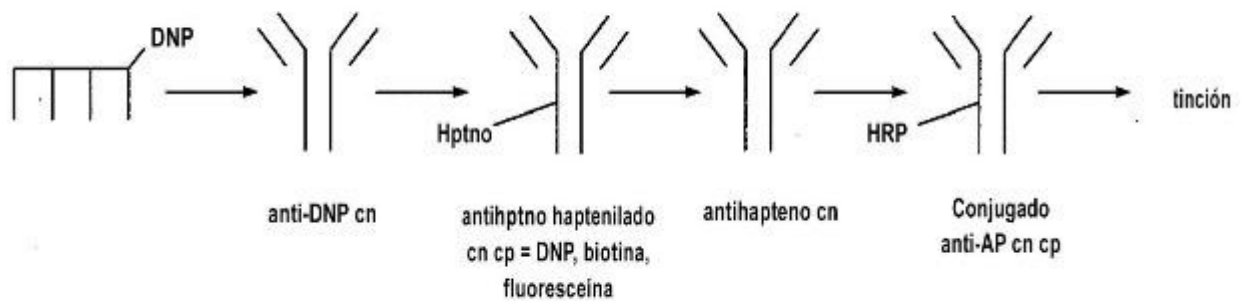


FIG. 14



FIG. 15



FIG. 16

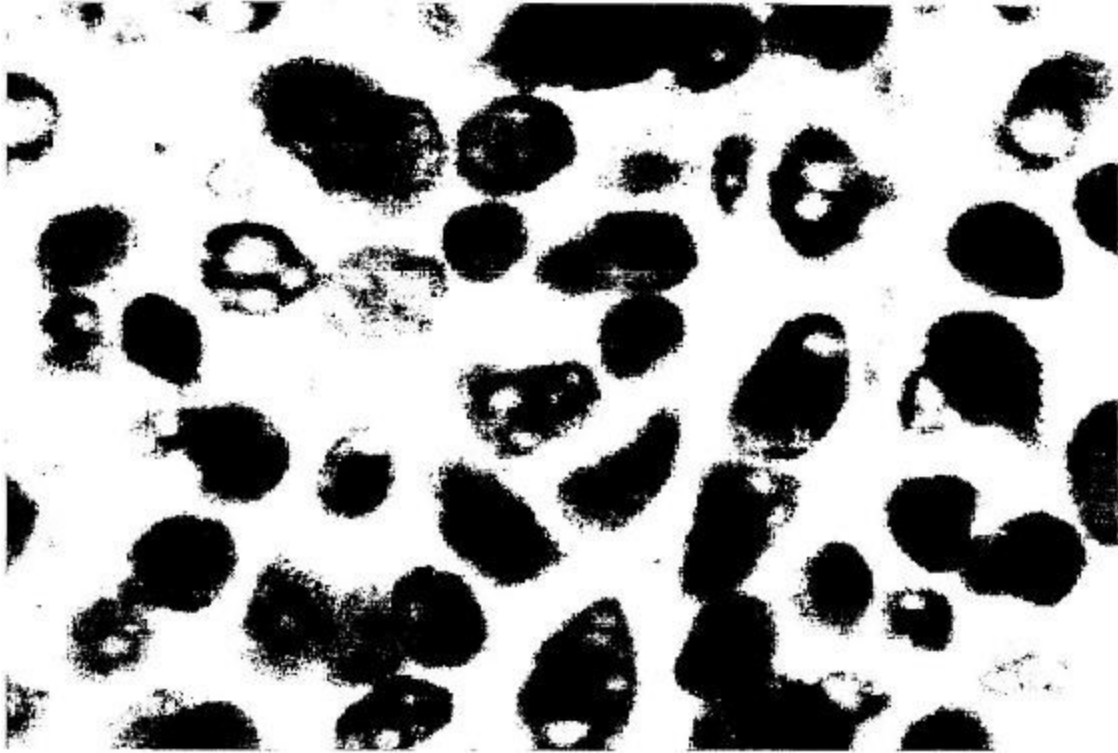


FIG. 17



FIG. 18

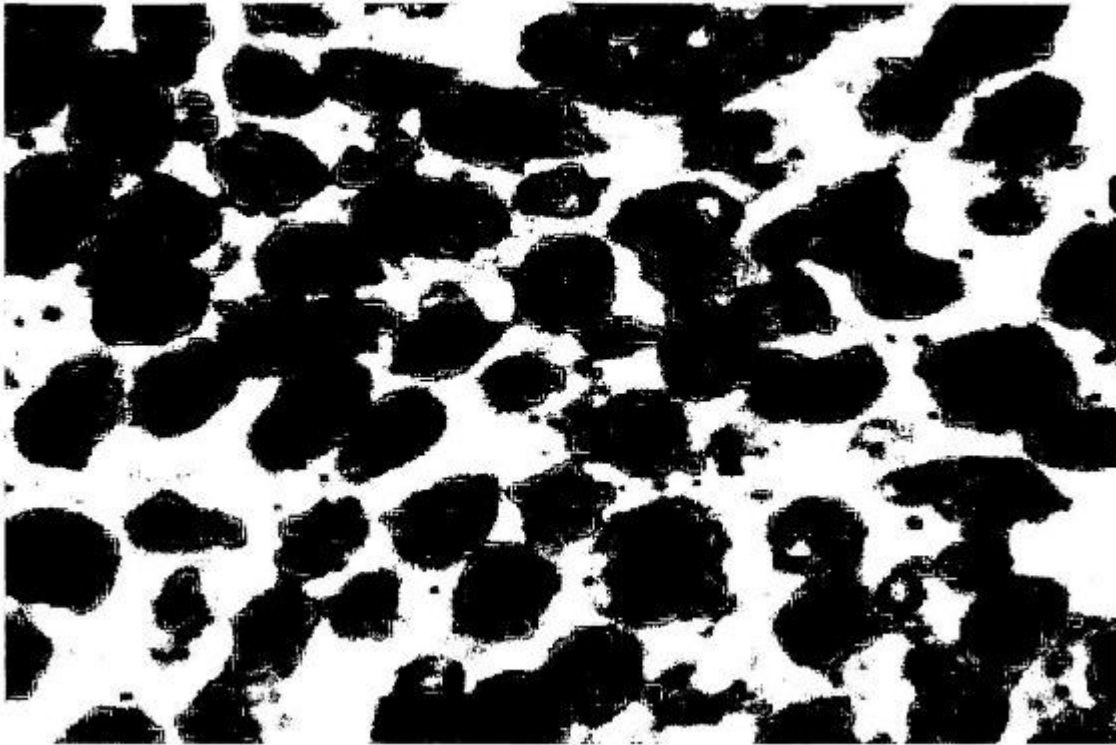


FIG. 19

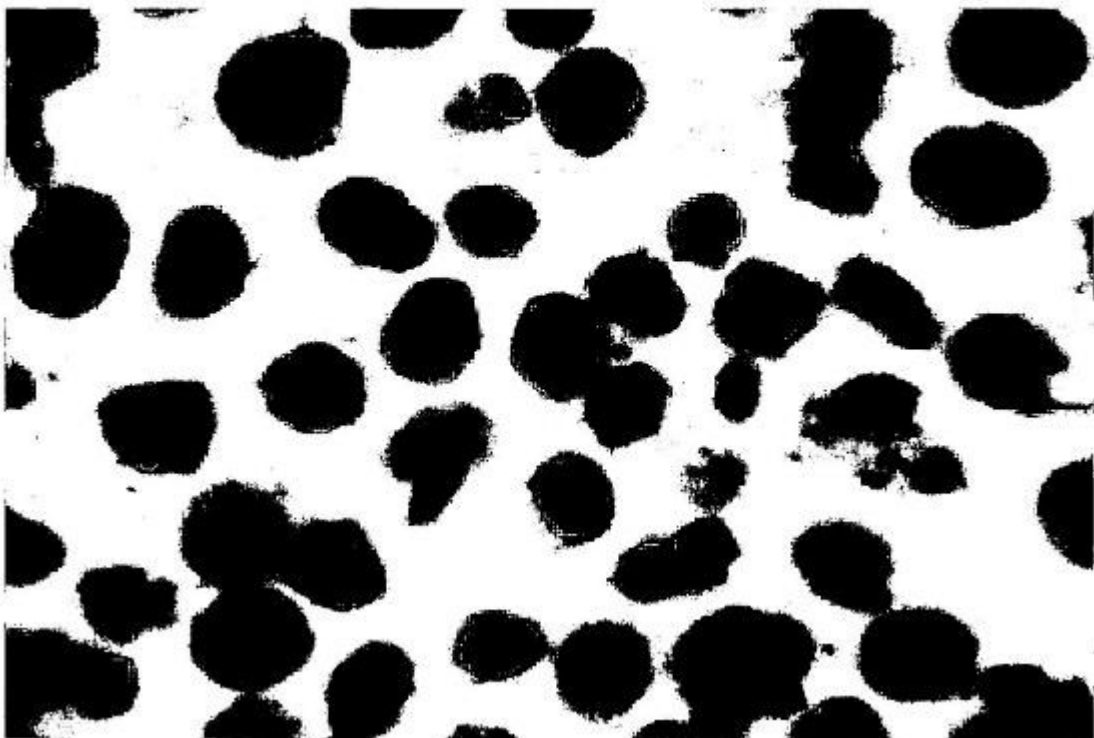


FIG. 20



FIG. 21

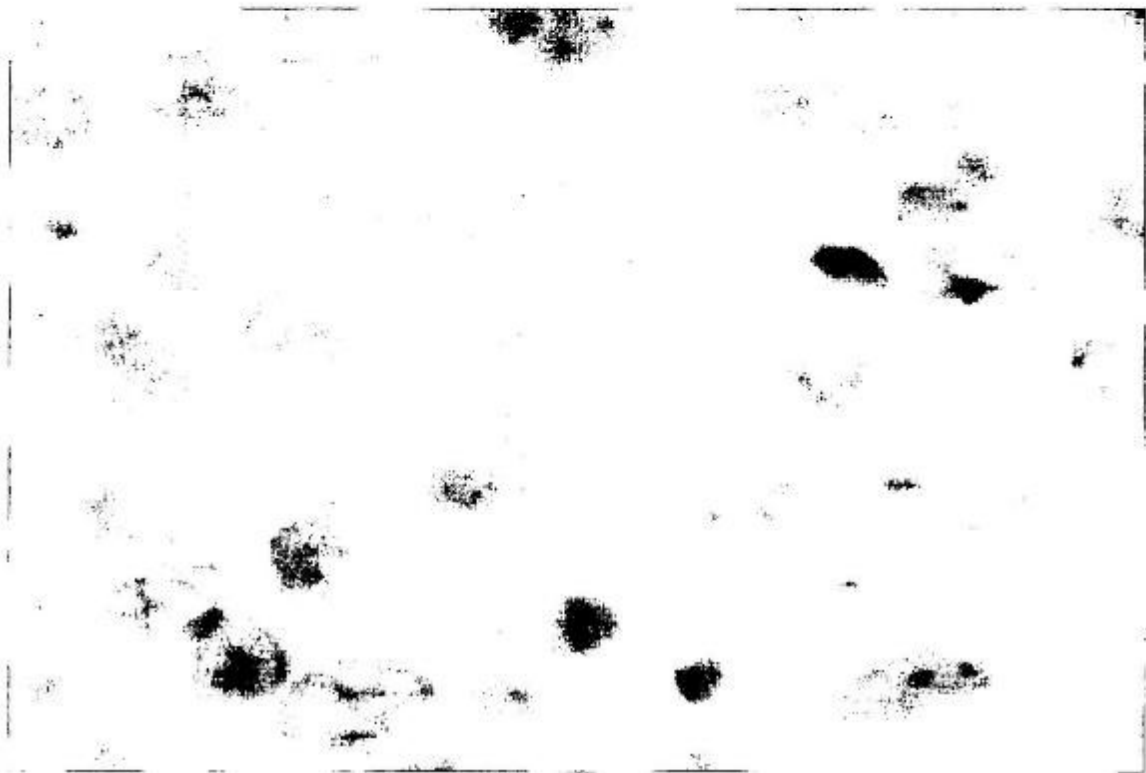


FIG. 22

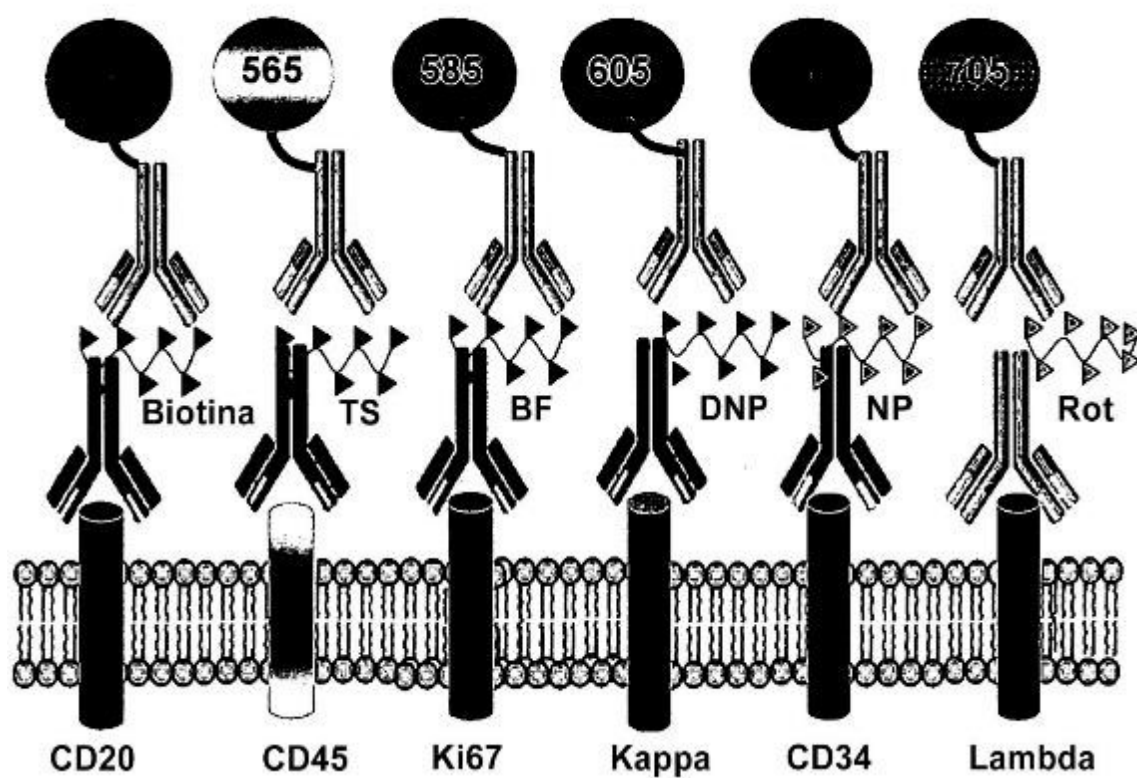


FIG. 23



FIG. 24

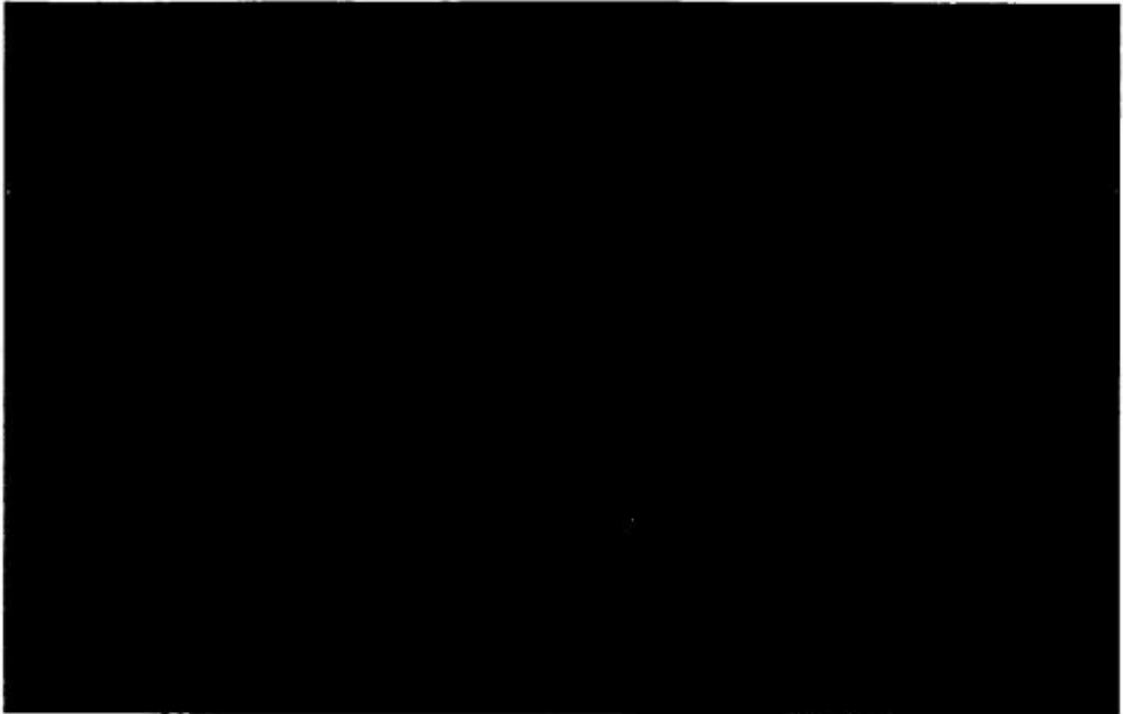


FIG. 25



FIG. 26

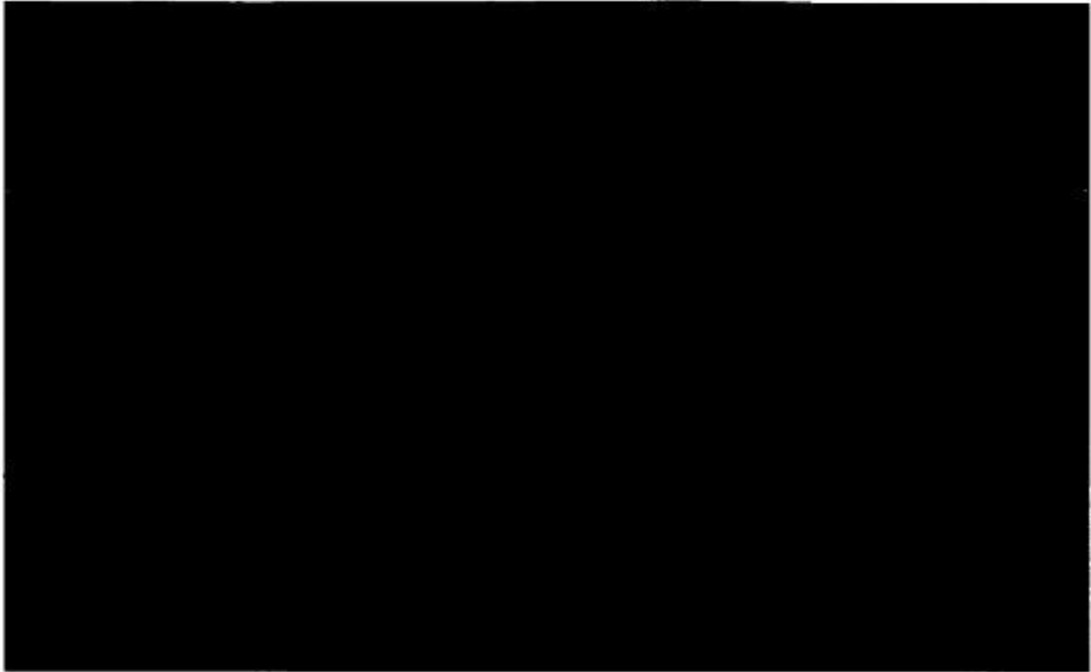


FIG. 27

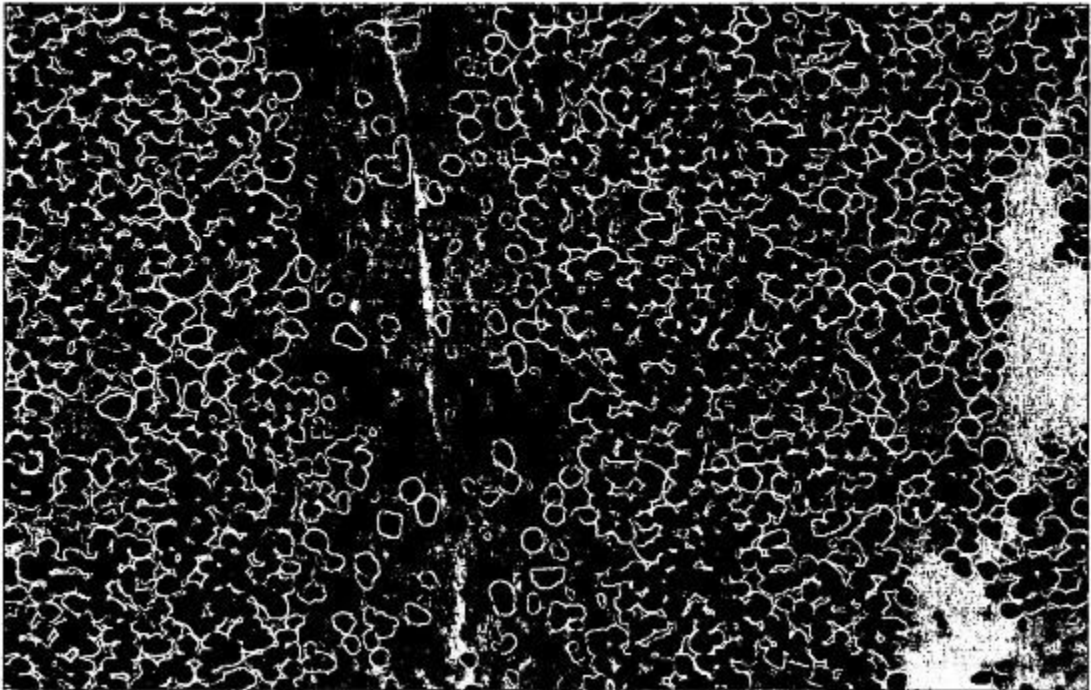


FIG. 28

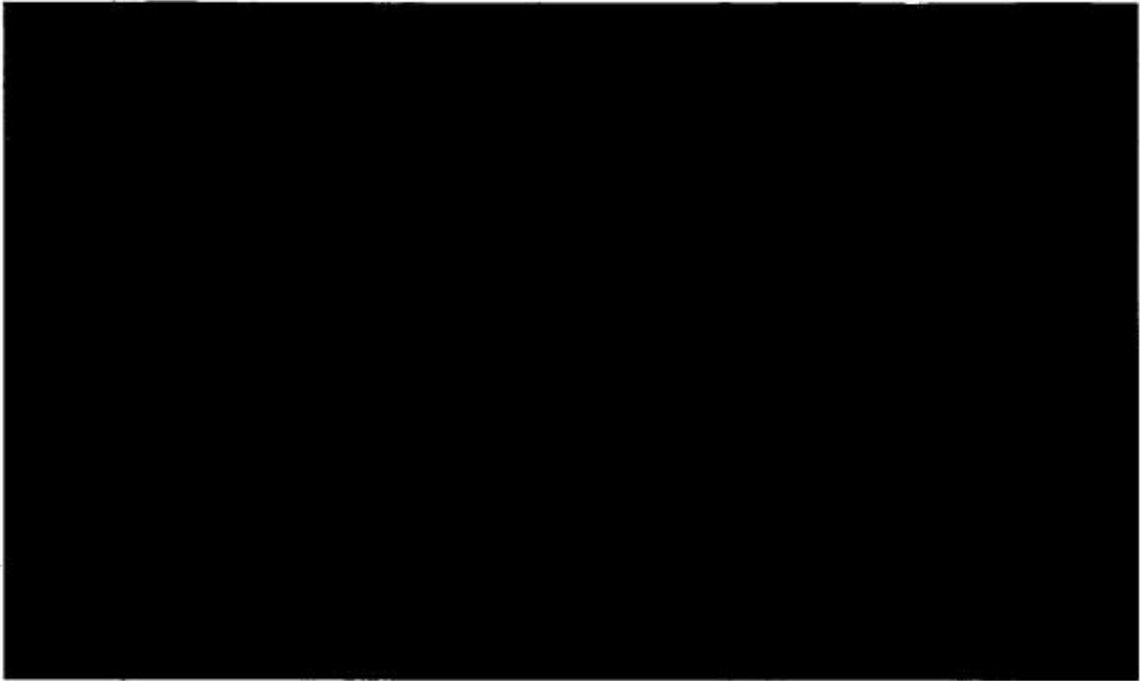


FIG. 29

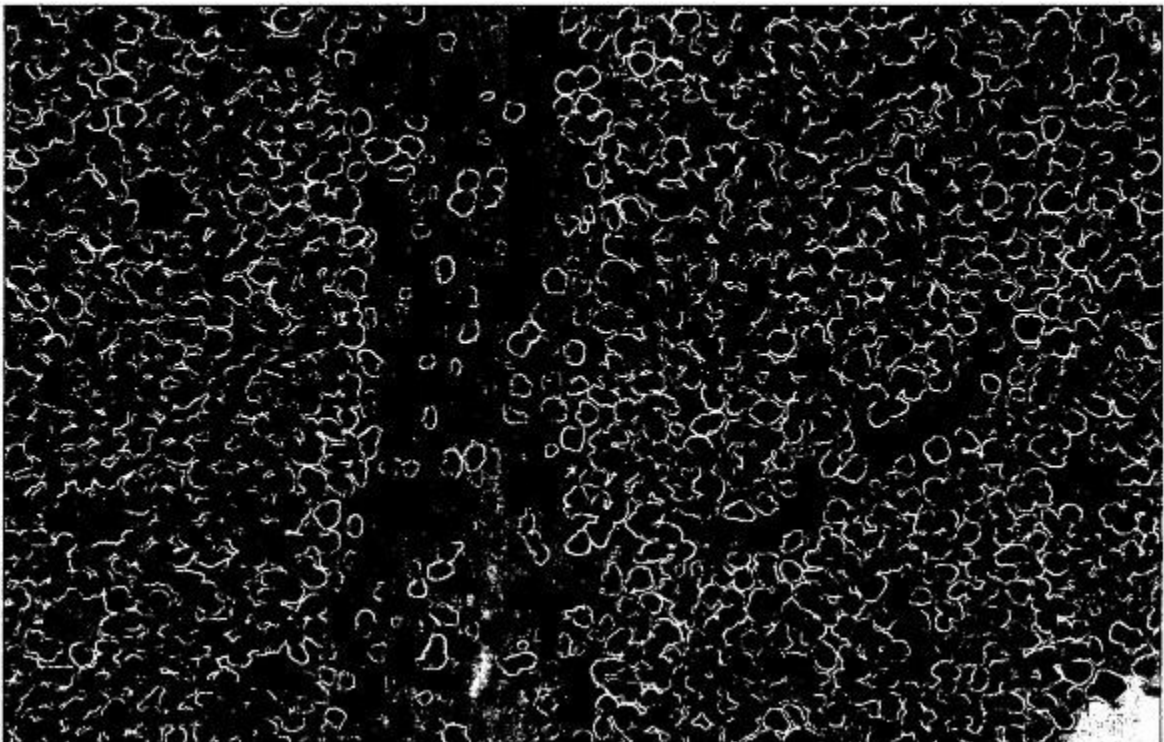


FIG. 30

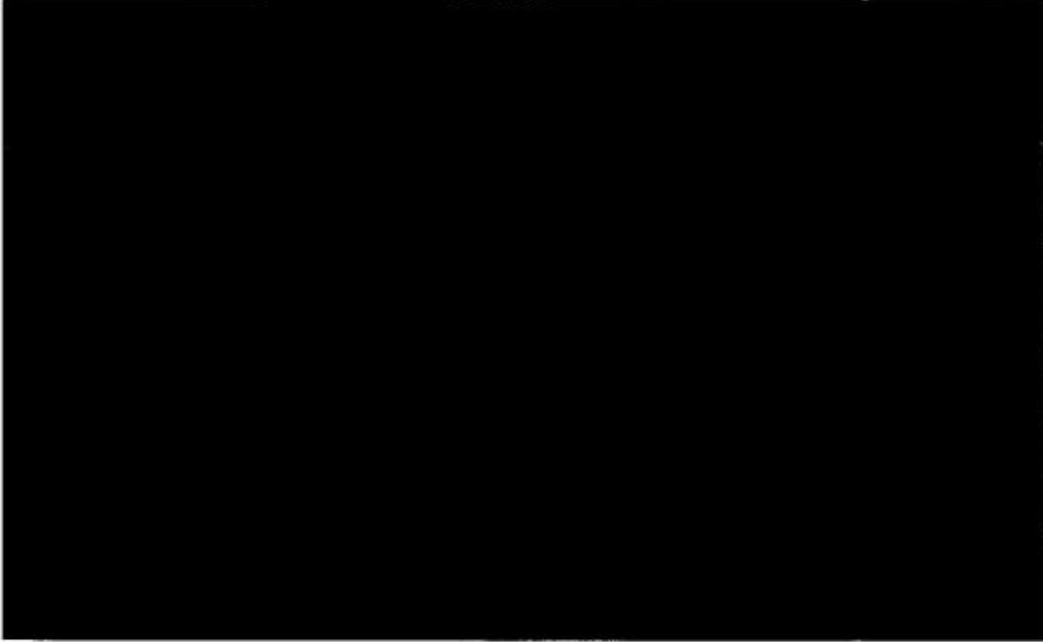


FIG. 31

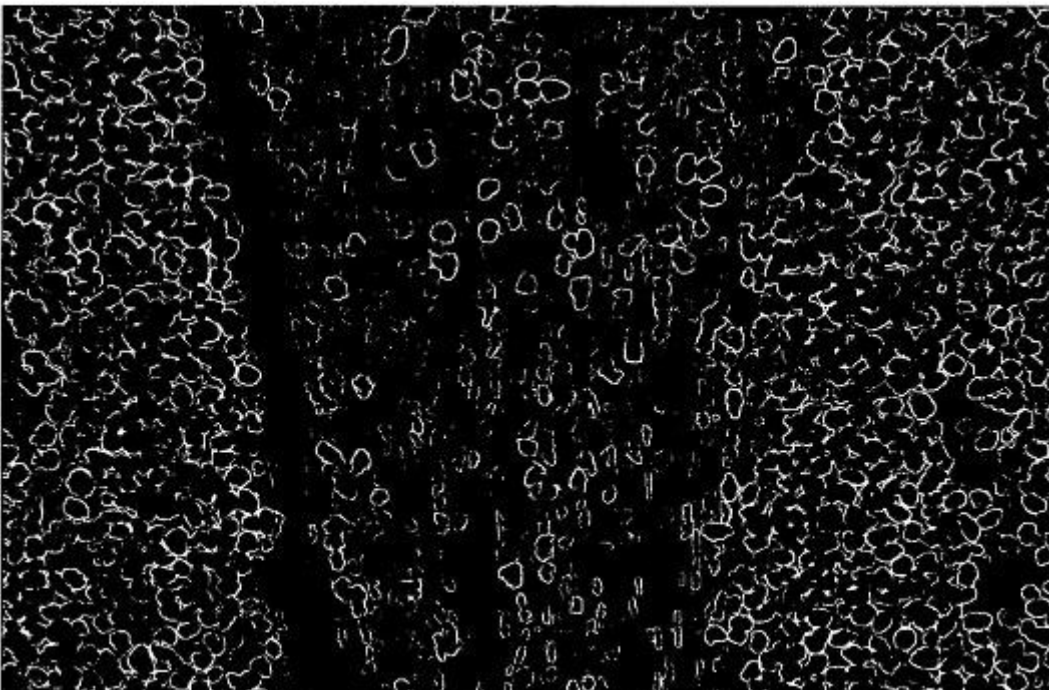


FIG. 32

