

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 129**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/62** (2007.01)  
**C12N 9/16** (2006.01)  
**C07C 319/02** (2006.01)  
**C07C 323/60** (2006.01)  
**C07C 327/28** (2006.01)  
**G01N 33/535** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2006 E 16001225 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3095467**

54 Título: **Conjugado anticuerpo-enzima**

30 Prioridad:

**23.11.2005 US 739794 P**

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

**03.02.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 804 129 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Conjugado anticuerpo-enzima

5 La presente invención se refiere a conjugados moleculares que comprenden un anticuerpo unido covalentemente a una enzima a través de un conector de hidracida, en los que dicho conector se une a una región Fc del anticuerpo.

10 Se ha desarrollado una amplia variedad de procedimientos para unir moléculas conjuntamente para formar conjugados. De particular interés son los conjugados biomoleculares que típicamente se preparan para combinar las funcionalidades de las moléculas unidas en una construcción. Un tipo de conjugado biomolecular combina una biomolécula que se une específicamente a otra molécula (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, una lectina o una avidina) y un marcador detectable (tal como un marcador fluorescente, nanopartícula fluorescente o una enzima).  
 15 Antonie Maassen J *et al.* (European Journal of Biochemistry, 134 (2), p327-330) divulgan el uso de un conector hidracida-tiol para introducir grupos sulfhidrilo en proteínas, que a continuación se pueden usar para introducir marcadores detectables.

20 C Bieniarz *et al.* (Bioconjugate Chemistry, 9(3), páginas 399-402) divulgan la conjugación de anticuerpos a fosfatasa alcalina usando conectores diferentes. El documento WO 88/07200 divulga un conjugado de un anticuerpo con peroxidasa de rábano picante por medio de un conector diferente.

25 Los conjugados de anticuerpos y marcadores detectables (conjugados de anticuerpos) se pueden usar en inmunoanálisis para detectar moléculas diana específicas en muestras biológicas. La porción de anticuerpo de dichos conjugados se une específicamente a una diana en la muestra y el marcador detectable se utiliza para proporcionar una señal detectable que indica la presencia y/o localización de la diana. Un tipo de conjugado que se ha empezado a usar ampliamente, en especial para el análisis inmunohistoquímico, es un conjugado de un anticuerpo y una enzima (conjugado anticuerpo-enzima). Se genera una señal detectable añadiendo un sustrato a la muestra en condiciones donde la porción enzimática del conjugado anticuerpo-enzima convierte el sustrato en un producto detectable (tal como un producto coloreado, de diferente color o fluorescente) en el sitio donde la porción de anticuerpo se une a su diana.

30 Los conjugados de anticuerpos se preparan típicamente usando reactivos de acoplamiento que se caracterizan por tener al menos dos grupos reactivos, de los que uno se hace reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo y el otro se hace reaccionar con un grupo funcional en el marcador detectable. Sin embargo, el acoplamiento puede dar lugar a la inactivación de cualquiera o ambos del anticuerpo y el marcador detectable. En particular, el acoplamiento  
 35 puede desactivar los conjugados anticuerpo-enzima a través de efectos estéricos o debido a que los reactivos de acoplamiento reaccionan con grupos funcionales localizados en porciones del anticuerpo y/o enzima que son cruciales para su especificidad y/o actividad catalítica. Además, algunos esquemas de acoplamiento dan lugar a conjugados que tienen una reducción en la solubilidad en agua.

40 Los esquemas de acoplamiento que pueden proporcionar conjugados anticuerpo-enzima con una reducción en el deterioro de especificidad de anticuerpo y/o actividad enzimática son deseables y permiten lograr mayores sensibilidades en ensayos inmunoquímicos tales como ensayos inmunohistoquímicos. Una mayor sensibilidad es de particular importancia para procedimientos automatizados donde las etapas de amplificación adicionales no son deseables.

45 La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

50 1. Un conjugado que comprende un anticuerpo unido covalentemente a un marcador detectable a través de un conector hidracida-tiol,

55 en el que el conector hidracida-tiol es uno o más de MBH, MBCH, MAMBH, THMBH, BTAL, BTHL, TAGD, THGD, un conector hidracida-tiol a base de PEG, un conector hidracida-tiol multifuncional, un conector hidracida-tiol multifuncional a base de PEG, y un conector poliacrilamida-hidracida-tiol, en el que un grupo hidracida del conector se une covalentemente a una región Fc del anticuerpo; y

60 en el que el marcador detectable es una enzima que tiene al menos un grupo reactivo con tiol, en el que un grupo tiol del conector hidracida-tiol se acopla al al menos un grupo reactivo con tiol de la enzima.

65 2. El conjugado del punto 1, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante.

3. El conjugado del punto 2, en el que la fosfatasa alcalina comprende fosfatasa alcalina reticulada.

4. El conjugado del punto 1, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-hapteno o un anticuerpo anti-anticuerpo.

5. El conjugado del punto 1, en el que el al menos un grupo reactivo con tiol es disulfuro de piridilo.

6. El conjugado del punto 1, en el que el anticuerpo se une covalentemente a más de un conector hidracida-tiol.

5 7. El conjugado del punto 1, en el que el marcador detectable es una enzima fosfatasa, el conector hidracida-tiol es un conector ácido mercaptobutírico-hidracida, y el al menos un grupo reactivo con tiol es al menos un grupo maleimida, en el que un grupo tiol del conector ácido mercaptobutírico-hidracida se une covalentemente al al menos a un grupo maleimida de la enzima fosfatasa.

10 8. El conjugado del punto 7, en el que la enzima fosfatasa es una fosfatasa alcalina.

9. El conjugado de uno cualquiera de los puntos 1 y 7, en el que el/los grupo(s) reactivo(s) con tiol es/son una maleimida/maleimidas.

15 10. Un conjugado de un anticuerpo y una enzima fosfatasa modificada, comprendiendo la enzima fosfatasa modificada al menos un grupo reactivo con tiol, en el que el anticuerpo y la enzima fosfatasa modificada se acoplan a través de un conector ácido mercaptobutírico-hidracida, y en el que un grupo hidracida del conector ácido mercaptobutírico-hidracida se une covalentemente a una región Fc del anticuerpo.

20 11. El conjugado del punto 10, en el que el al menos un grupo reactivo con tiol es una maleimida.

12. El conjugado del punto 10, en el que el al menos un grupo reactivo con tiol es disulfuro de piridilo.

25 13. El conjugado del punto 10, en el que un grupo tiol del conector ácido mercaptobutírico-hidracida se une covalentemente al al menos un grupo reactivo con tiol de la enzima fosfatasa modificada.

Se divulga un conjugado molecular que incluye un conector hidracida-tiol. En un modo de realización, se proporciona un conjugado anticuerpo-marcador detectable que incluye un conector hidracida-tiol unido covalentemente a la porción Fc del anticuerpo. El conjugado específico de Fc de este modo de realización proporciona una mejora en la sensibilidad de detección, haciendo de este modo que la detección inmunohistoquímica de una molécula diana sea más susceptible a aplicaciones de automatización y alto rendimiento.

35 También se divulga un procedimiento para preparar un conjugado usando un conector hidracida-tiol. En un modo de realización, no se necesita un grupo protector para un grupo tiol del conector debido a que el conector se hace reaccionar con una primera molécula en condiciones donde el grupo tiol está sustancialmente presente en su forma de ácido neutro y por tanto sustancialmente no reactiva. Bajo dichas condiciones, se puede formar un enlace covalente entre un grupo hidracida del compuesto conector y una primera molécula mientras se conserva sustancialmente el grupo tiol para la reacción posterior con un grupo reactivo con tiol de una segunda molécula.

40 También se divulgan conectores hidracida-tiol y procedimientos para preparar conectores hidracida-tiol. Además, se describen procedimientos para usar un conjugado divulgado para detectar una molécula diana en una muestra tal como una sección de tejido o muestra de citología. Los procedimientos de detección de una molécula diana se pueden automatizar fácilmente debido a la mejora en la sensibilidad presentada por los conjugados divulgados. En determinados modos de realización, se proporcionan ensayos multiplexados que usan los conjugados divulgados, por ejemplo, ensayos multiplexados que emplean conjugados de anticuerpos divulgados que tienen moléculas fluorescentes o nanopartículas fluorescentes como marcador detectable.

Las figuras muestran:

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

55 La FIG. 2 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de Lambda en tejido de amígdala usando un conjugado de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina divulgado y usando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

60 La FIG. 3 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de CMV en tejido de pulmón usando un conjugado de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina divulgado y usando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

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

La FIG. 5 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de PVH en tejido de xenoinjerto

de CaSki usando un conjugado de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina divulgado y usando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

5 La FIG. 6 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de PVH en tejido de xenoinjerto de HeLa usando un conjugado de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina divulgado y usando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

10 La FIG. 7 es un par de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de PVH en tejido de xenoinjerto de SiHa usando un conjugado de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina divulgado y usando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

15 La FIG. 8 es una serie de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de PVH en muestras de citología usando un conjugado de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina divulgado y usando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

La FIG. 9 es un par de imágenes que muestran patrones de tinción para la detección de actina en el tejido muscular usando un conjugado de anticuerpo específico de Fc-fosfatasa alcalina divulgado y usando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

20 La FIG. 10 es una serie de imágenes que muestran una comparación de la sensibilidad de los conjugados anticuerpo-enzima divulgados entre sí y con los conjugados anticuerpo-enzima preparados por otros procedimientos.

Otros aspectos se ilustran por las siguientes descripciones y ejemplos, que proceden con respecto a las abreviaturas y términos a continuación.

25

*I. Abreviaturas*

**Ab** - anticuerpo

30 **(Ab - AP)** - conjugado anticuerpo-fosfatasa alcalina

**AP** - fosfatasa alcalina

35 **BSA** - seroalbúmina bovina

**CMV** - citomegalovirus

**EBER** - ARN específico de Epstein-Barr

40 **DL** - marcador detectable

**Fc** - fragmento cristalizante

45 **HRP** - peroxidasa de rábano picante

**IHQ** - inmunohistoquímica

**ISH** - hibridación *in situ*

50 **MAL** - maleimida

**MBCH** - ácido mercaptobutírico-carbohidracida

55 **MBH** - ácido mercaptobutírico-hidracida

**NHS** - *N*-hidroxi-succinimida

**PEG** - polietilenglicol

60 **SBM** - molécula de unión específica

*II. Términos*

65 Los términos "un", "una" y "el/la" incluyen referentes tanto en singular como plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

- 5 El término "aminación" como se usa en el presente documento se refiere a la reacción de un grupo carbonilo de un aldehído o una cetona con un grupo amina, en el que un compuesto que contiene amina tal como una amina o una hidracida reacciona con el aldehído o cetona para formar en primer lugar una base de Schiff que a continuación se puede reorganizar reversiblemente a una forma más estable, u opcionalmente reducirse para evitar la inversión de la reacción. Las condiciones de "aminación reductora" incluyen la adición de un agente reductor, más típicamente la adición de un agente reductor suave tal como cianoborohidruro de sodio o uno de sus congéneres, por ejemplo, triacetoxiborohidruro de sodio. Otros agentes reductores suaves que se pueden emplear incluyen diversos amina-boranos.
- 10 El término "anticuerpo" conjuntamente se refiere a una inmunoglobulina o molécula de tipo inmunoglobulina (incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier organismo, por ejemplo, en mamíferos tales como humanos, cabras, conejos y ratones) o un fragmento de la misma que se une específicamente a una diana (o un grupo de dianas altamente similares) para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas. En algunos modos de realización, un anticuerpo se une específicamente a una diana con una constante de unión que es al menos  $10^3 \text{ M}^{-1}$  mayor,  $10^4 \text{ M}^{-1}$  mayor o  $10^5 \text{ M}^{-1}$  mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra. En otros modos de realización, un anticuerpo tiene un valor de  $K_d$  para la unión a un determinante antigénico (tal como un hapteno o epítipo) que es del orden de  $10^{-6} \text{ M}$  o menor, tal como  $10^{-9} \text{ M}$  o menor, o incluso  $10^{-12} \text{ M}$  o menor. Los valores de  $K_d$  se pueden determinar, por ejemplo, por ELISA competitivo (ensayo de inmunoadsorción enzimática) o usando un dispositivo de resonancia de plasmón superficial tal como el Biacore T100, que está disponible en Biacore, Inc., Piscataway, NJ. 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, 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). Los anticuerpos incluyen preparaciones de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales. Aunque un anticuerpo de un conjugado divulgado se puede unir específicamente a cualquier molécula particular o cualquier grupo particular de moléculas altamente similares, en modos de realización particulares, el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-hapteno (que se puede usar, por ejemplo, para detectar una secuencia de sonda marcada con hapteno dirigida a una secuencia de ácido nucleico de interés). En modos de realización particulares, el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-anticuerpo que se puede usar como un anticuerpo secundario en un inmunoanálisis. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender un anticuerpo anti-IgG tal como un anticuerpo anti-IgG de ratón, un anticuerpo anti-IgG de conejo o un anticuerpo anti-IgG de cabra.
- 35 La frase "condiciones donde un grupo tiol de un conector hidracida-tiol está sustancialmente presente en su forma de ácido neutro" se refiere a condiciones, tales como condiciones de pH, en las que menos de aproximadamente un 1 % del grupo tiol (-SH; la forma de ácido neutro protonado) del conector está presente en su forma de base conjugada (-S<sup>-</sup>; forma cargada negativamente no protonada). Por ejemplo, bajo dichas condiciones, menos de aproximadamente un 0,1 %, menos de aproximadamente un 0,01 %, o incluso menos de aproximadamente un 0,001 % del conector puede estar en la forma de base conjugada. Las condiciones donde el grupo tiol del compuesto conector hidracida-tiol está sustancialmente presente en su forma de ácido neutro incluyen un pH de menos de aproximadamente 7, por ejemplo, un pH de menos de aproximadamente 6 tal como un pH de menos de aproximadamente 5,5. En modos de realización particulares, dichas condiciones incluyen un intervalo de pH, por ejemplo, de un pH de aproximadamente 3 a un pH de aproximadamente 7, de un pH de aproximadamente 4 a un pH de aproximadamente 7, de un pH de aproximadamente 4 a un pH de aproximadamente 6, de un pH de aproximadamente 4,5 a un pH de aproximadamente 5,5, o cualquier subintervalo de cada uno de estos intervalos. En otros modos de realización, el límite superior del intervalo de pH en el que un grupo tiol de un conector particular está sustancialmente presente en su forma de ácido neutro (menos de un 1 % del grupo tiol estando presente como la forma de base conjugada) puede ser mayor que 7, como un pH de 8. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un límite superior para el intervalo de pH en el que un grupo tiol dado estará sustancialmente presente en la forma de ácido neutro usando la ecuación de Henderson-Hasselbach y un valor de pKa para un grupo tiol del conector. Aún en otros modos de realización, un grupo tiol de un conector particular puede estar sustancialmente presente en su forma de ácido neutro en un sistema de disolventes para el que no se puede determinar un pH exacto, y un experto en la técnica reconocerá que los sistemas de disolventes son menos polares que el agua pueden ayudar a mantener el grupo tiol en su forma de ácido neutro a pH aparentes mayores. De forma alternativa, se puede hacer una determinación experimental de si, bajo condiciones particulares, un grupo tiol de un conector está sustancialmente presente en su forma de ácido neutro determinando si el tiol reducirá un enlace disulfuro presente en otra molécula. Por ejemplo, se puede realizar una determinación del número de grupos tiol libres (por ejemplo, usando el reactivo de Ellman) introducidos en una molécula que tiene disulfuros (tal como una inmunoglobulina) por contacto con el conector bajo las condiciones particulares de pH (o pH estimado para sistemas no acuosos). La adición de un exceso del conector hidracida-tiol (tal como un exceso de 50 veces o más) durante un período de tiempo (tal como una hora o más) se puede seguir por la determinación del número promedio de tioles libres introducidos en la molécula. Si se generan tioles libres en un grado sustancial (tal como mayor que un promedio de dos tioles introducidos por molécula de inmunoglobulina), se muestra que el tiol del conector no está sustancialmente presente en su forma de ácido neutro bajo las condiciones analizadas. Por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7, un exceso de cien veces del conector MBH con relación a una inmunoglobulina producirá un promedio de aproximadamente 2 tioles por molécula de inmunoglobulina. A un pH menor de 5, un exceso

de mil veces del conector MBH producirá, en promedio, sustancialmente menos de 1 tior por inmunoglobulina en 24 horas. Estos resultados demuestran que para el conector MBH, el grupo tior está sustancialmente presente en su forma de ácido neutro a un pH de aproximadamente 7 o menor, puesto que a medida que se reduce el pH, el equilibrio entre la forma de ácido neutro y su base conjugada se desplaza más hacia la forma de ácido neutro.

Un "conjugado" se refiere a dos o más moléculas (y/o materiales tales como nanopartículas) que se unen covalentemente en una construcción más grande. En algunos modos de realización, un conjugado incluye una o más biomoléculas (tales como péptidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, azúcares, polisacáridos, lípidos, glicoproteínas y lipoproteínas) unidas covalentemente a una o más de otras moléculas, tales como una o más de otras biomoléculas. En otros modos de realización, un conjugado incluye una o más moléculas de unión específica (tales como anticuerpos y secuencias de ácido nucleico) unidas covalentemente a uno o más marcadores detectables (tales como moléculas fluorescentes, nanopartículas fluorescentes, haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos).

Un "marcador detectable" es 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 conjugua con una molécula de unión específica, el marcador detectable se puede usar para localizar y/o cuantificar la diana a la que se dirige la molécula de unión específica. De este modo, la presencia y/o concentración de la diana en una muestra se puede detectar 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 una sonda de ácido nucleico o anticuerpo específico para una diana, se puede detectar indirectamente a través del uso de un segundo marcador detectable que se conjugua con una molécula que se une específicamente al primer marcador detectable. Se pueden conjuguar 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 la detección simultánea de las múltiples dianas en una muestra. Una señal detectable se puede generar por cualquier mecanismo conocido o aún por descubrir, incluyendo 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 moléculas o materiales coloreados, 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,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa o  $\beta$ -lactamasa; moléculas fluorescentes tales como fluoresceínas, 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 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 están 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'-acino-di-[3-etilbenzotiazolin-sulfonato] (ABTS), *o*-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), *o*-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactopiranosido (MU-Gal), *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -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 usar una enzima tal como fosfatasa alcalina en combinación con un ion metálico soluble en agua y un sustrato inactivo redox de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo redox por la enzima, y el agente activo redox reduce el ion metálico, haciendo que forme un precipitado detectable. (Véanse, 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 patente de EE. UU. n.º 2004/0265922). Los procedimientos de detección metalográfica incluyen usar una enzima oxidoreductasa (tal como 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 se deben unir primero a una molécula transportadora más grande tal como una proteína o ácido polinucleico para generar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de haptenos incluyen dinitrofenol, 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. El marcador detectable de la

presente invención es una enzima.

El término "conjugado específico de Fc" como se usa en el presente documento se refiere a 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 específica de la inmunoglobulina.

El término "grupo hidracida" se refiere a un grupo hidracida (-CO-NH-NH<sub>2</sub>); un grupo carbohidracida (-NH-NH-CO-NH-NH<sub>2</sub>); hidracisemicarbácida (-NH-CO-NH-NH<sub>2</sub>); un grupo tiosemicarbácida (-NH-CS-NH-NH<sub>2</sub>); un grupo tiocarbácida (-NH-NH-CS-NH-NH<sub>2</sub>); un grupo ácido carbónico-dihidracina (-NH-CO-NH-NH-CO-NH-NH<sub>2</sub>) o un derivado que contiene azufre del mismo; o un grupo carboxilato-hidracina (-O-CO-NH-NH<sub>2</sub>) o un derivado que contiene azufre del mismo.

El término "grupo reactivo con hidracida" se refiere a 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 con hidracida. Los grupos reactivos con 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 con 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  $\beta$ -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.

El término "conector hidracida-tiol" se refiere a una molécula que incluye uno o más grupos hidracida y uno o más grupos tiol (-SH) unidos covalentemente a través de uno o más átomos de unión. El/Los grupo(s) hidracida y grupo(s) tiol de un conector hidracida-tiol se puede(n) unir a través de uno o más de diversos grupos de átomos incluyendo grupos metileno (-CH<sub>2</sub>-), grupos alquileo ramificados, grupos hidracida adicionales, grupos aromáticos, grupos heteroaromáticos, grupos alicíclicos, grupos polialquilenglicol (tales como grupos óxido de etileno; -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), grupos amida (-CONH-), grupos amina (-NH-), grupos éter (-O-) y combinaciones de los mismos. Un "conector hidracida-tiol a base de PEG" se refiere a un conector que incluye 1 o más grupos etilenglicol como parte de su estructura. Un "conector hidracida-tiol multifuncional" se refiere a un conector ramificado que tiene al menos un grupo hidracida, al menos un grupo tiol y al menos un grupo reactivo adicional, tal como un grupo hidracida adicional, un grupo tiol adicional o cualquier otro grupo útil para preparar conjugados moleculares. En algunos modos de realización, un conector hidracida-tiol a base de PEG comprende un conector PEG discreto (dPEG), que se puede preparar de materiales de partida de dPEG tales como los divulgados en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20060020134, y se puede adquirir en Quanta Biodesign (Powell, OH). Los ejemplos de grupos reactivos adicionales que se pueden incluir en un conector hidracida-tiol polifuncional incluyen grupos maleimida y ésteres activos, tales como ésteres de N-hidroxisuccinimida y grupos hidroxilo (-OH). Los ejemplos adicionales de grupos reactivos se pueden encontrar en Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8.

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.

El término "molécula de unión específica" se refiere a una molécula que se une específicamente a una segunda

molécula. "Se une específicamente" quiere decir que la molécula de unión específica se une a la segunda molécula para la exclusión sustancial de otras moléculas que están presentes en una muestra (por ejemplo, la constante de unión de la molécula de unión específica es al menos  $10^2 \text{ M}^{-1}$  mayor,  $10^3 \text{ M}^{-1}$  mayor,  $10^4 \text{ M}^{-1}$  mayor o  $10^5 \text{ M}^{-1}$  mayor que una constante de unión para otras moléculas en la muestra). Los ejemplos de moléculas de unión específica incluyen ácidos nucleicos, receptores, anticuerpos, enzimas, lectinas y avidinas. Los ejemplos de interacciones de unión específica en las que pueden participar moléculas de unión específica incluyen formación de dúplex y tríplex de secuencias de ácido nucleico, interacciones receptor-ligando (tales como interacciones folato-receptor de folato), interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones enzima-sustrato, reacciones lectina-glúcido e interacciones avidina-biotina (tales como interacciones estreptavidina-biotina).

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

El término "grupo reactivo con tiol" se refiere a un átomo o átomos que pueden reaccionar con y formar un enlace covalente con un grupo tiol. Un grupo reactivo con tiol puede ser una parte intrínseca de una molécula o se puede introducir en la molécula a través de la reacción con una o más de otras moléculas. Los ejemplos de grupos reactivos con tiol incluyen aceptores de Michael no polimerizables, grupos haloacetilo (tales como grupos bromoacetilo y yodoacetilo), haluros de alquilo, maleimidias, aciridinas, grupos acrililo, vinilsulfonas, benzoquinonas, grupos aromáticos que se pueden someter a sustitución nucleófila tales como grupos fluorobenceno (tales como grupos tetra y pentafluorobenceno), y grupos disulfuro tales como grupos piridildisulfuro y tioles activados con reactivo de Ellman. Los ejemplos adicionales de cada uno de estos tipos de grupos serán evidentes para los expertos en la técnica. Otros ejemplos e información con respecto a condiciones de reacción y procedimientos para intercambiar un tipo de grupo reactivo por otro para añadir un grupo reactivo con tiol se proporcionan en Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8. En un modo de realización particular, una molécula conectora heterobifuncional se une a una molécula para introducir un grupo reactivo con tiol. Por ejemplo, un conector que tiene un grupo maleimida y un grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) se puede unir a un grupo amina en una molécula a través del grupo NHS, proporcionando de este modo a la molécula un grupo maleimida reactivo con tiol que se puede hacer reaccionar con un grupo tiol en otra molécula (tal como una introducida usando un conector hidracida-tiol y el procedimiento divulgado) para formar un conjugado.

### III. Visión general

Un experto en la técnica reconocerá que el procedimiento divulgado se puede usar para unir cualquier combinación de moléculas que tienen grupos funcionales que pueden reaccionar con un conector hidracida-tiol. La descripción no limitante que sigue se centra en conjugados de anticuerpos y, más en particular, en conjugados anticuerpo-enzima. Aunque los conjugados divulgados específicamente son conjugados anticuerpo-enzima, se contemplan conjugados entre otras biomoléculas (tales como secuencias de ácido nucleico) y otros marcadores detectables (tales como haptenos, marcadores fluorescentes, nanopartículas fluorescentes y proteínas fluorescentes, tales como proteína fluorescente verde).

En consecuencia, en un aspecto, se divulga para un procedimiento para formar un conjugado de dos o más moléculas. El procedimiento incluye hacer reaccionar un conector hidracida-tiol con una primera molécula (tal como un anticuerpo) que tiene un grupo reactivo con hidracida (tal como un aldehído) para formar una primera molécula tiolada. La reacción se lleva a cabo en condiciones donde un grupo tiol del conector hidracida-tiol está sustancialmente presente en su forma de ácido neutro (protonada). La primera molécula tiolada se puede hacer reaccionar a continuación con una segunda molécula que tiene un grupo reactivo con tiol (tal como un grupo maleimida introducido en la segunda molécula) para formar el conjugado. En un modo de realización particular, la reacción de la primera molécula con el conector se lleva a cabo a un pH de aproximadamente  $\text{pH} = 4$  a aproximadamente  $\text{pH} = 7$ . En otros modos de realización particulares, el conector hidracida-tiol puede ser un conector hidracida-tiol a base de PEG, un conector hidracida-tiol multifuncional o un conector hidracida-tiol multifuncional a base de PEG.

En otro modo de realización, el procedimiento se puede usar para unir covalentemente una molécula de unión específica a un marcador detectable. En un modo de realización más particular, el procedimiento se puede usar para unir una primera molécula que tiene una porción glucosilada a otra molécula. En este modo de realización, la porción glucosilada se oxida en primer lugar para generar un grupo aldehído que se puede hacer reaccionar con un conector hidracida-tiol. En un modo de realización incluso más particular, la primera molécula glucosilada puede ser un anticuerpo que tiene una región Fc glucosilada. Se forma un anticuerpo tiolado específico de Fc por reacción con un conector hidracida-tiol, y el anticuerpo tiolado específico de Fc se puede hacer reaccionar con un marcador detectable que tiene un grupo reactivo con tiol.

En otro aspecto, se proporciona una variedad de conectores hidracida-tiol y procedimientos para preparar los mismos como se explica en la visión general sintética y los ejemplos específicos que siguen. Otro aspecto es un conjugado preparado con un conector divulgado. En un aspecto adicional, se divulga 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. Visión general sintética

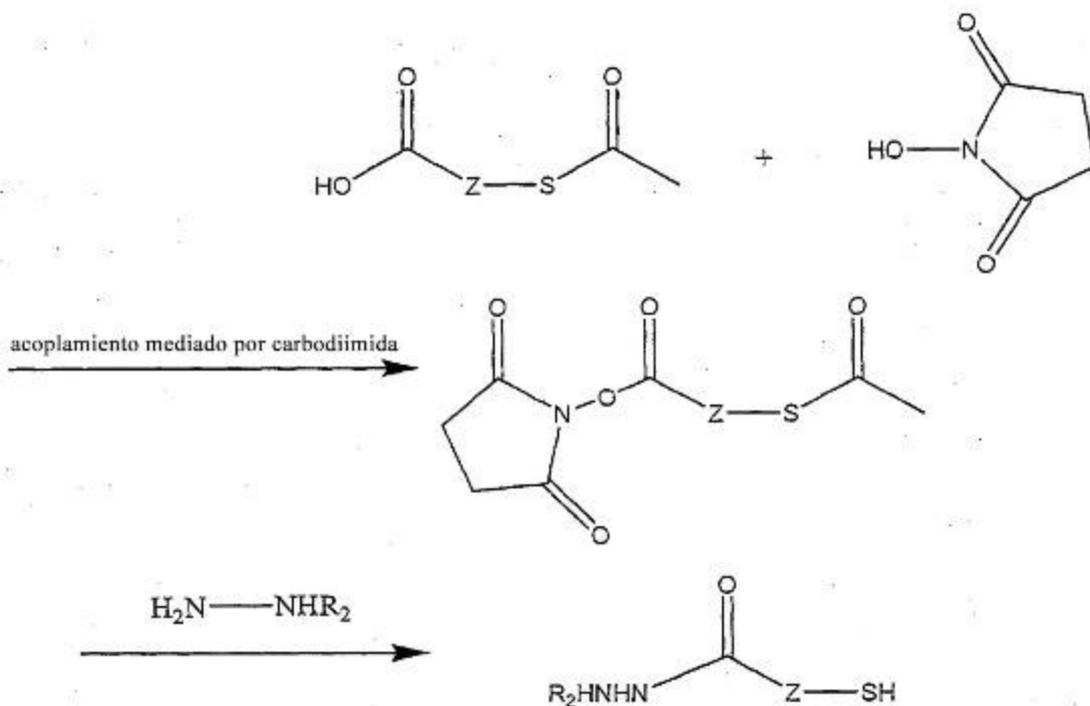
5 A. Preparación de conectores hidracida-tiol

Aunque se puede usar cualquier conector hidracida-tiol en el procedimiento divulgado de preparación de un conjugado, en un modo de realización, se puede proporcionar un conector hidracida-tiol haciendo reaccionar una tiolactona con hidracina, carbohidracida o una dihidracida de acuerdo con el esquema 1 a continuación, en el que  $n = 1, 2$  o  $3$ ,  $R_1$  es H,  $-\text{CONHNH}_2$  o  $-\text{CO-A-CONHNH}_2$ , donde A es un grupo divalente que tiene entre 1 y 100 átomos de carbono que se puede interrumpir por uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, N o S), y puede estar sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En modos de realización más particulares, A es un grupo divalente que consiste en 1-10 grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y/o 1-24 grupos óxido de etileno ( $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ). En modos de realización incluso más particulares, A es un grupo divalente que consiste en 1-6 grupos metileno o 4-12 grupos óxido de etileno.



Esquema 1

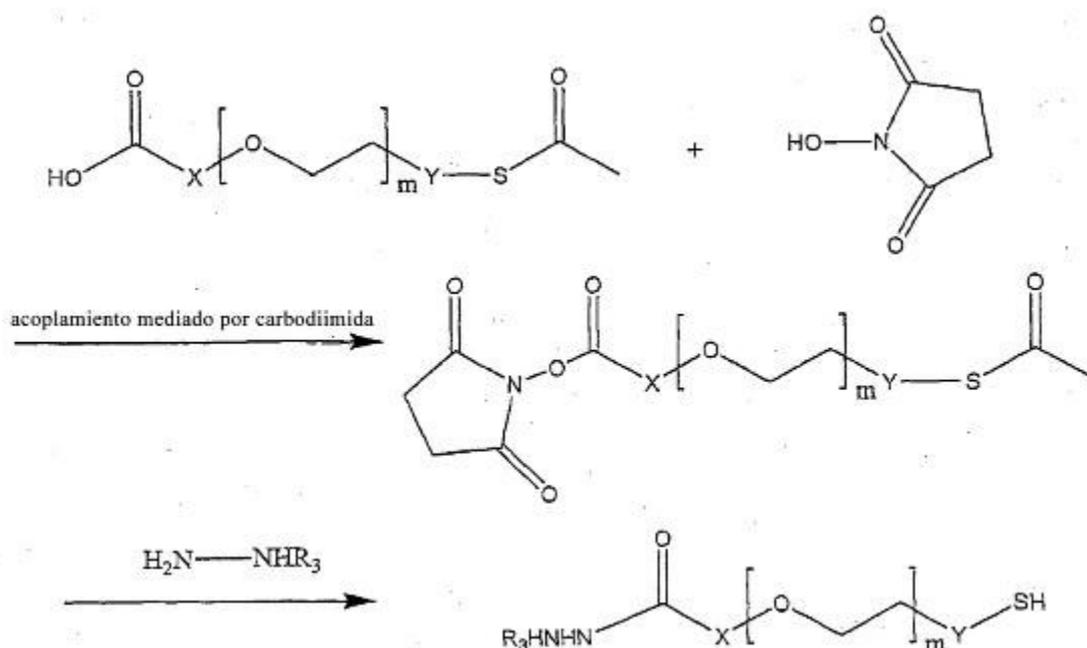
También se puede proporcionar una amplia variedad de conectores hidracida-tiol que se pueden usar en el procedimiento divulgado de acuerdo con el esquema 2 a continuación. En este esquema, Z es un grupo divalente que tiene de 1 a 100 átomos de carbono, en el que el grupo divalente se puede interrumpir por uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, N o S), y puede estar sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En modos de realización más particulares, Z es un grupo divalente que consiste en 1-10 grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y/o 1-24 grupos óxido de etileno ( $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ). En modos de realización incluso más particulares, Z es un grupo divalente que consiste en 1-6 grupos metileno o 4-12 grupos óxido de etileno.  $R_2$  es H,  $-\text{CONHNH}_2$  o  $-\text{CO-A-CONHNH}_2$ , donde A es un grupo divalente que tiene entre 1 y 100 átomos de carbono que se puede interrumpir por uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, N o S), y puede estar sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina.



Esquema 2

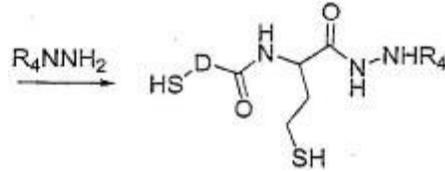
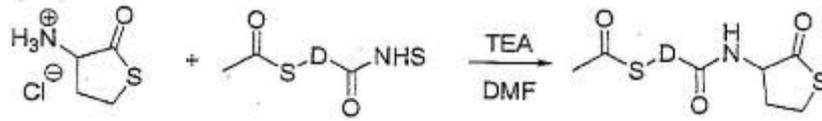
En algunos modos de realización, se proporciona un conector hidracida-tiol a base de PEG que se puede usar en el

procedimiento divulgado y se prepara de acuerdo con el esquema 3. En el esquema 3,  $m=2$  a 50;  $R_3$  es H,  $-\text{CONHNH}_2$ , o  $-\text{CO-A-CONHNH}_2$ , donde A es un grupo divalente que tiene entre 1 y 100 átomos de carbono que se puede interrumpir por uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, N o S), y puede estar sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina; y X e Y son independientemente un enlace o un grupo divalente que tiene de 1 a 20 átomos de carbono. En modos de realización más particulares, A es un grupo divalente que consiste en 1-10 grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y/o 1-24 grupos óxido de etileno ( $-\text{CH-CH}_2-\text{O}-$ ). En modos de realización incluso más particulares, A es un grupo divalente que consiste en 1-6 grupos metileno o 4-12 grupos óxido de etileno. Los grupos divalentes X e Y se pueden interrumpir por uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, N o S), y pueden estar sustituidos, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxilo, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En modos de realización más particulares, X e Y son independientemente un enlace o  $-(\text{CH}_2)_p-$  donde  $p = 1$  a 3. La carbodiimida usada en la reacción de acoplamiento puede ser cualquier carbodiimida que proporcione el acoplamiento deseado de acuerdo con el esquema. Los ejemplos de carbodiimidas adecuadas incluyen DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) y DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida). En un modo de realización de trabajo que se analiza a continuación, se usa DCC para lograr el acoplamiento.

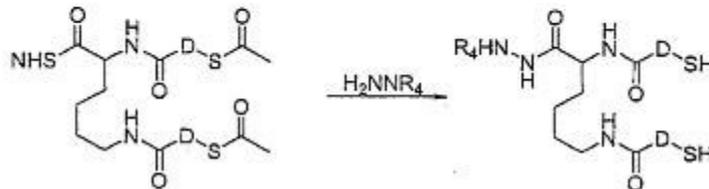
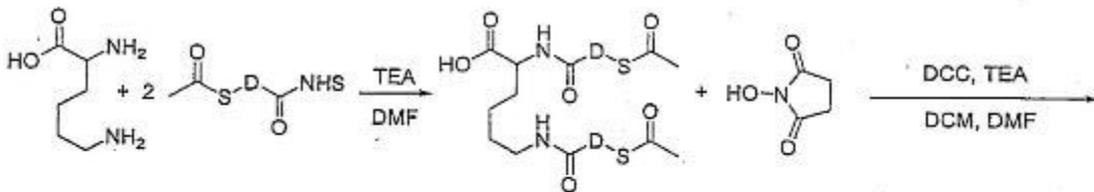


Esquema 3

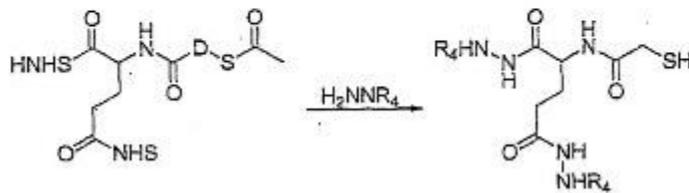
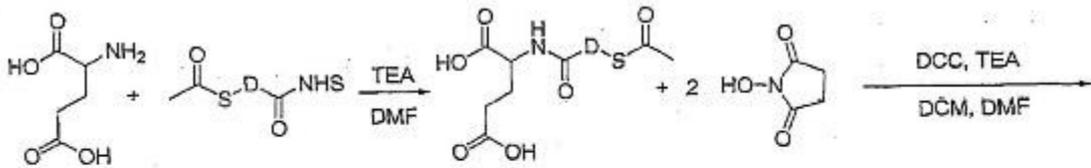
En otros modos de realización, se proporciona un conector hidracida-tiol multifuncional que se puede usar en el procedimiento divulgado. Los esquemas 4a, 4b, 4c y 4d a continuación muestran procedimientos generales para preparar conectores multifuncionales de homocisteína, lisina, ácido glutámico y homoserina, respectivamente. En los esquemas 4a, 4b, 4c y 4d, D es un grupo divalente que tiene de 1 a 100 átomos de carbono, en el que el grupo divalente se puede interrumpir por uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, N o S), y puede estar sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En modos de realización más particulares, D es un grupo divalente que consiste en 1-10 grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y/o 1-24 grupos óxido de etileno ( $-\text{CH-CH}_2-\text{O}-$ ). En modos de realización incluso más particulares, D es un grupo divalente que consiste en 1-6 grupos metileno o 4-12 grupos óxido de etileno. También en los esquemas 4a, 4b, 4c y 4d,  $R_4$  es H,  $-\text{CONHNH}_2$  o  $-\text{CO-A-CONHNH}_2$ , donde A es un grupo divalente que tiene entre 1 y 100 átomos de carbono que se puede interrumpir por uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, N o S), y puede estar sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En modos de realización más particulares, A es un grupo divalente que consiste en 1-10 grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y/o 1-24 grupos óxido de etileno ( $-\text{CH-CH}_2-\text{O}-$ ). En modos de realización incluso más particulares, A es un grupo divalente que consiste en 1-6 grupos metileno o 4-12 grupos óxido de etileno.



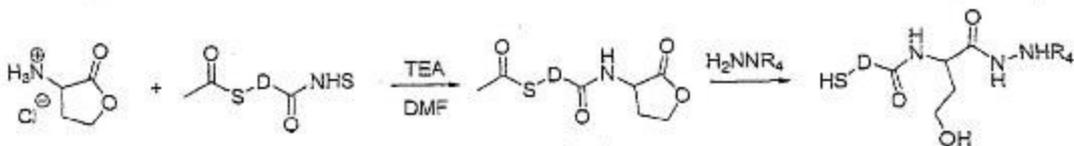
Esquema 4a



Esquema 4b



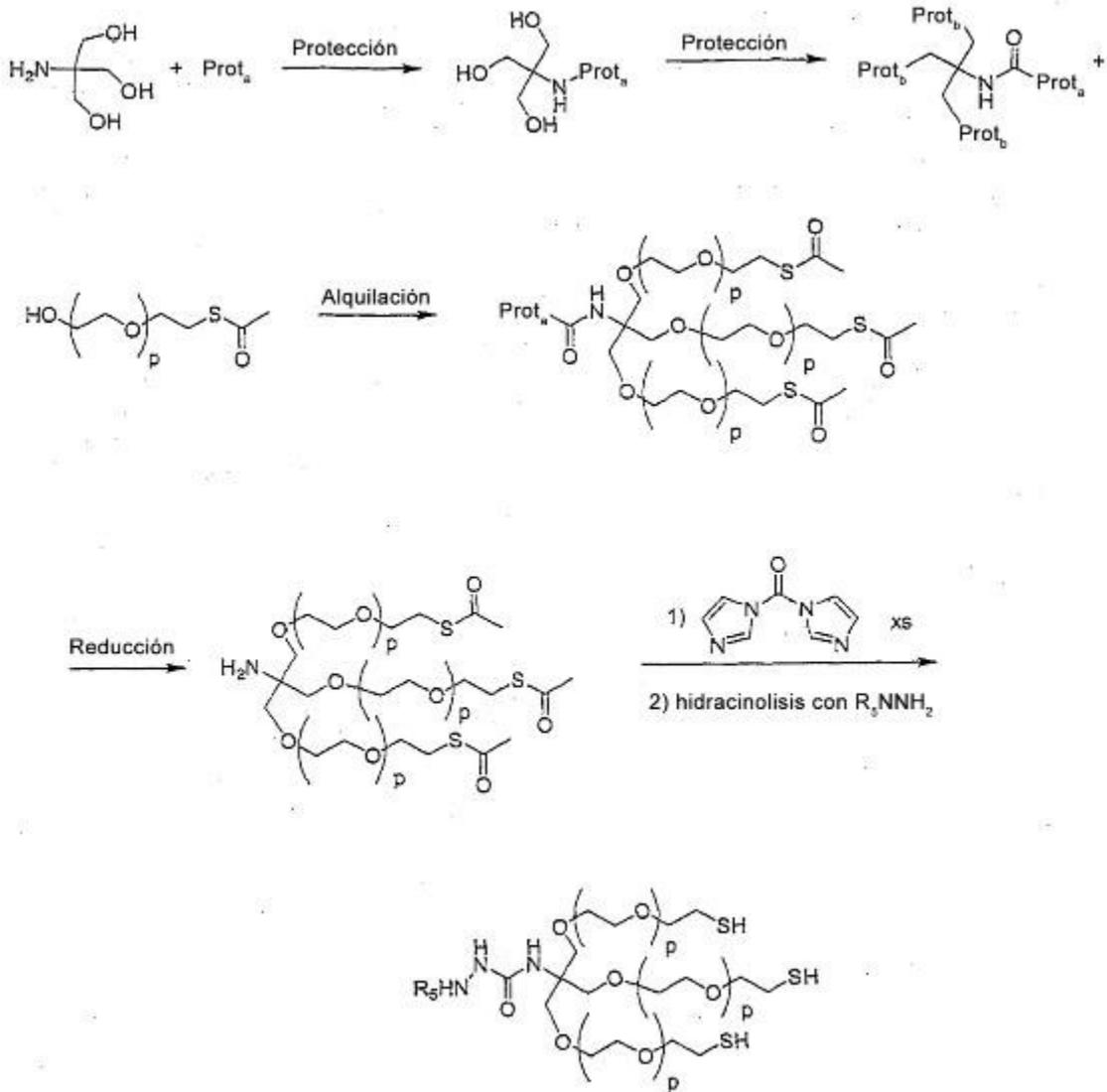
Esquema 4c



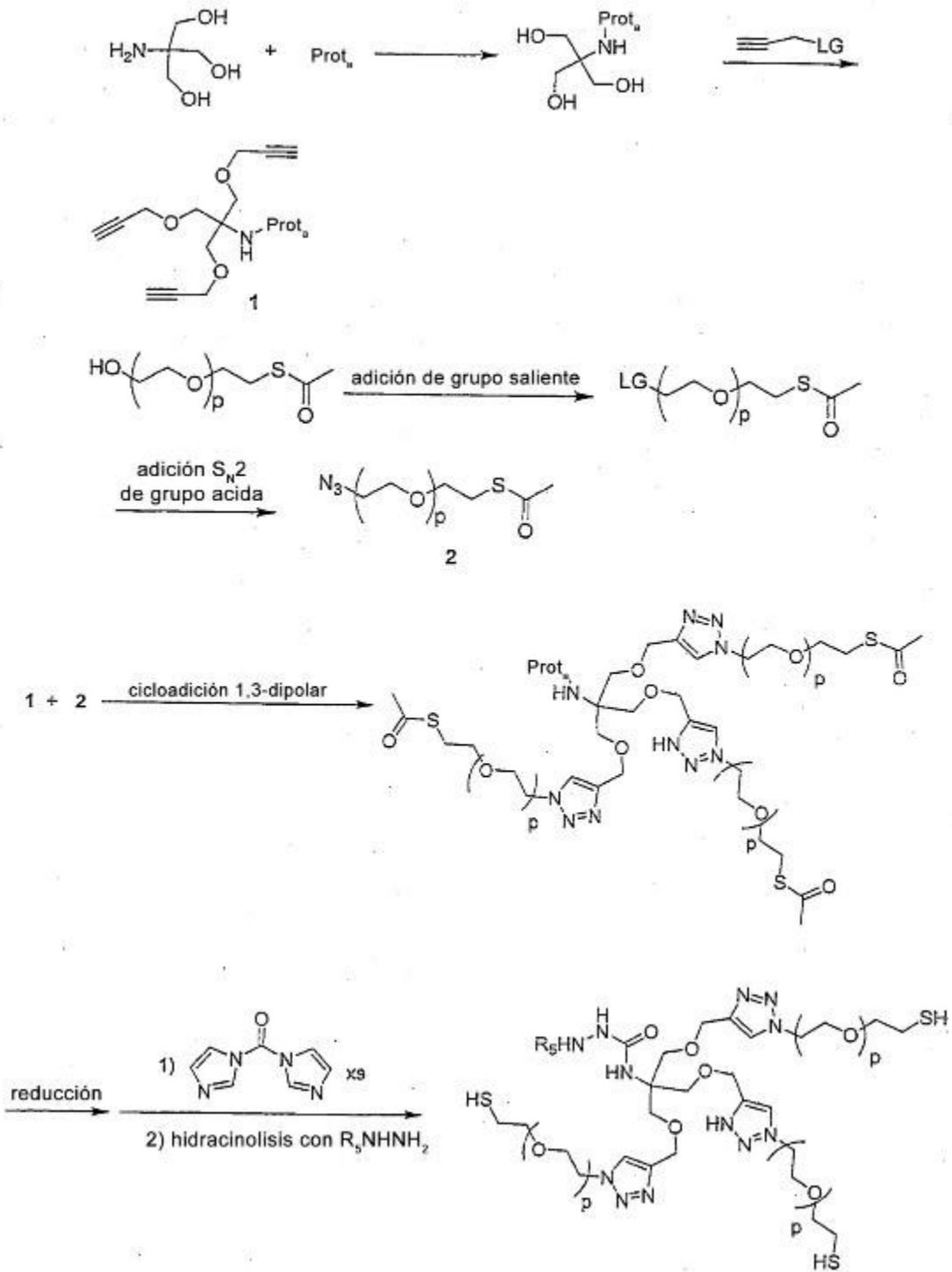
Esquema 4d

En otros modos de realización particulares, se proporciona un conector hidracida-tiol multifuncional a base de PEG que se puede usar en el procedimiento divulgado. Los esquemas 5a, 5b y 5c ilustran esquemas sintéticos generales

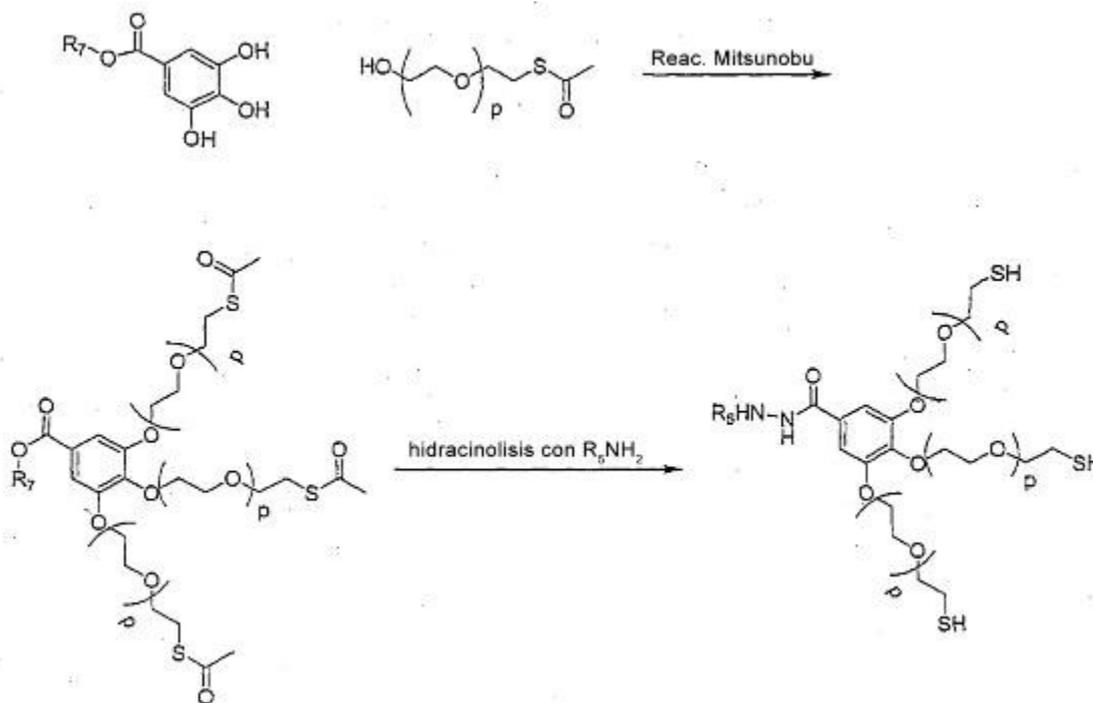
5 que se pueden usar para proporcionar dichos conectores. En estos esquemas,  $p = 2$  a  $50$  y  $R_5$  es H,  $-\text{CONHNH}_2$  o  $-\text{CO-A-CONHNH}_2$ , donde A es un grupo divalente que tiene entre 1 y 100 átomos de carbono que se puede interrumpir por uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, N o S), y puede estar sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, hidroxilo, alcoxi, acilo, carboxi, halógeno, sulfonato, oxo, fosfonato y/o amina. En modos de realización más particulares, A es un grupo divalente que consiste en 1-10 grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y/o 1-24 grupos óxido de etileno ( $-\text{CH-CH}_2-\text{O}-$ ). En modos de realización incluso más particulares, A es un grupo divalente que consiste en 1-6 grupos metileno o 4-12 grupos óxido de etileno.  $R_7$  puede ser H, alquilo o un grupo protector.



Esquema 5a



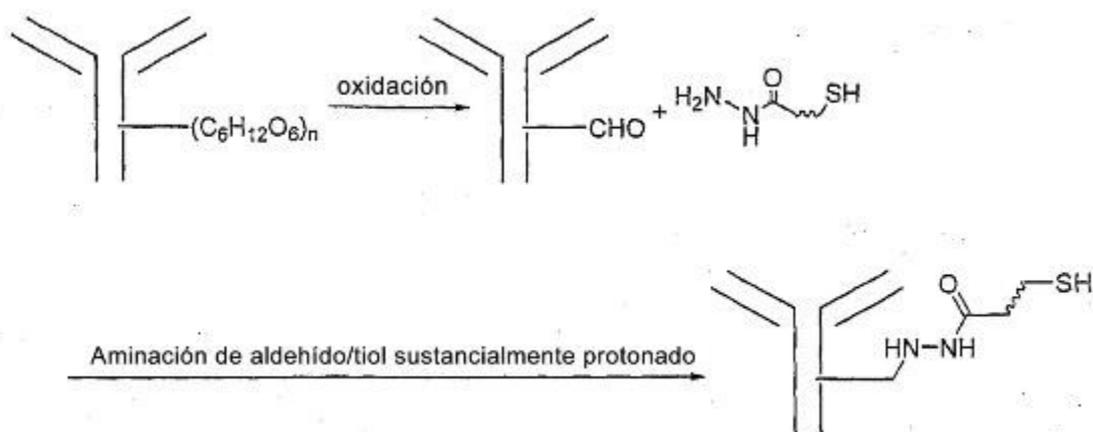
Esquema 5b



Esquema 5c

5 *B. Preparación de conjugados de anticuerpos específicos de Fc*

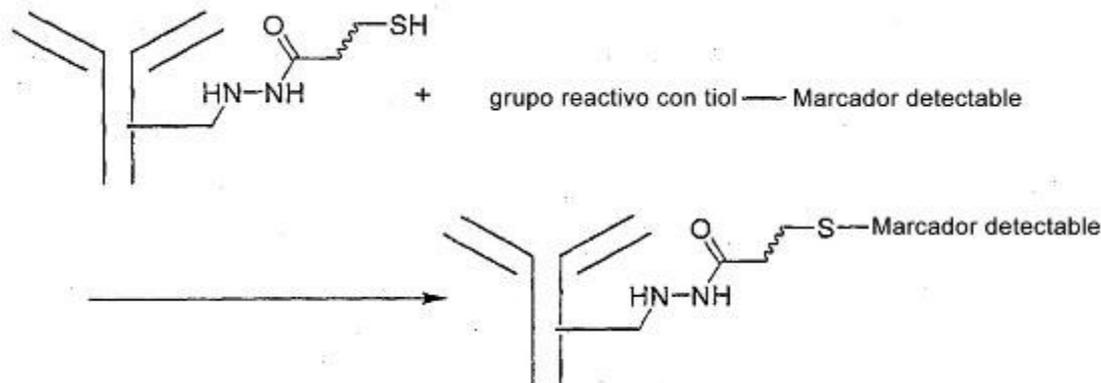
En un modo de realización, un conjugado que incluye un conector hidracida-tiol comprende un conjugado de un anticuerpo y un marcador detectable. En un modo de realización particular, el conjugado comprende un conjugado específico de Fc de un anticuerpo y un marcador detectable. En un modo de realización más particular, el conjugado comprende un conjugado específico de Fc de un anticuerpo y una enzima tal como fosfatasa alcalina. El esquema 6 ilustra un procedimiento de adición de un conector hidracida-tiol a un anticuerpo de manera específica de Fc.



Esquema 6

En el esquema 6, un anticuerpo que tiene una porción Fc glucosilada se oxida específicamente en el sitio para generar uno o más grupos aldehído en los restos glucídicos de la porción Fc glucosilada. El/Los grupo(s) aldehído se hace(n) reaccionar a continuación con un conector hidracida-tiol bajo condiciones donde el grupo tiol del conector hidracida-tiol se protona sustancialmente (sustancialmente en su forma de ácido neutro). Bajo dichas condiciones, el grupo hidracida del conector se une covalentemente a la porción Fc del anticuerpo mientras deja el grupo tiol sustancialmente sin reaccionar (tal como sustancialmente sin reaccionar con enlaces disulfuro en el anticuerpo) y por tanto retenido para una reacción posterior con una segunda molécula que tiene un grupo reactivo con tiol tal como un marcador detectable que tiene un grupo reactivo con tiol. La reacción incluye deseablemente otra reacción con un reductor suave (un ejemplo de una aminación reductora) para formar una hidrazona más estable. El acoplamiento del anticuerpo tiolado con un marcador detectable que tiene un grupo reactivo con tiol (tal como un grupo maleimida) se ilustra en el

esquema 7.



5

Esquema 7

### V. Ejemplos

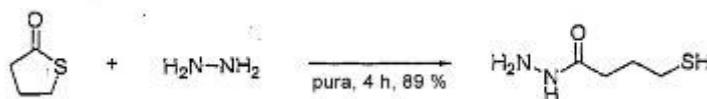
Los siguientes ejemplos no limitantes de modos de realización de trabajo se proporcionan para ilustrar además determinados aspectos de la invención.

10

#### Ejemplo 1 - Síntesis de ácido mercaptobutírico-hidracida (MBH)

15

En un modo de realización de trabajo particular, se preparó un conector hidracida-tiol a partir de  $\gamma$ -butirotiolactona de acuerdo con el esquema 8.



Esquema 8

20

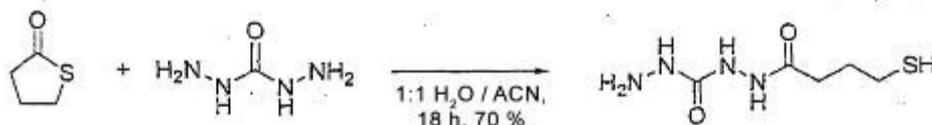
En particular, a una solución agitada de monohidrato de hidracina (2,43 ml, 50 mmol) se le añadió lentamente  $\gamma$ -butirotiolactona (0,43 ml, 5 mmol). Después de 4 horas, el exceso de hidracina se retiró a vacío. Se purificó el producto bruto por cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , 1:19 MeOH/MeCN) para dar el producto deseado como un aceite incoloro. Rendimiento: 599 mg (89 %): RMN de  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,56 (s, 1 H), 3,89 (s, 2 H), 2,56-2,47 (q,  $J=6,9$  Hz, 2 H), 2,28-2,22 (t,  $J=7,0$  Hz, 2 H), 1,94-1,83 (p,  $J=7,0$  Hz, 2H), 1,35-1,29 (t,  $J=8,0$  Hz, 1 H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,02, 32,38, 29,16, 23,94; ESI-HRMS  $m/z$  135,05955 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OS}$  calc. 135,05921).

25

#### Ejemplo 2 - Síntesis de ácido mercaptobutírico-carbohidracida (MBCH)

En otro modo de realización de trabajo particular, se preparó un conector carbohidracida-tiol a partir de  $\gamma$ -butirotiolactona de acuerdo con el esquema 9.

30



Esquema 9

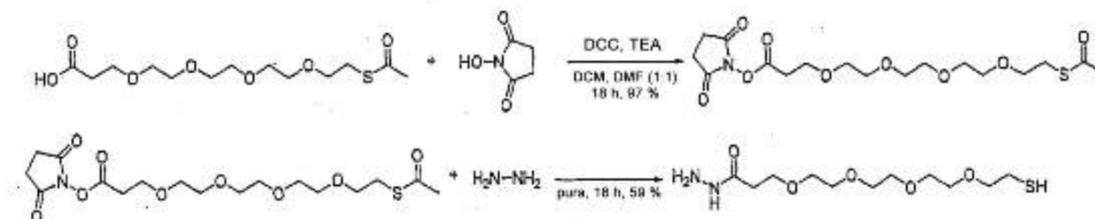
35

En particular, se diluyó  $\gamma$ -butirotiolactona (0,43 ml, 5 mmol) en acetonitrilo (5 ml) y a continuación se añadió lentamente a una solución de carbohidracida (2,25 g, 25 mmol) en agua desionizada (5 ml). Se agitó la reacción a 40 °C durante 18 h y a continuación se concentró a vacío. Se retiró el producto bruto por filtración con acetonitrilo y cromatografía flash ( $\text{SiO}_2$ , 1:19 MeCN/MeOH) para dar el producto como un sólido blanco. Rendimiento: 672 mg (70 %); RMN de  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  2,62-2,56 (t,  $J=7,1$  Hz, 2 H), 2,47-2,41 (t,  $J=7,4$  Hz, 2 H), 1,98-1,87 (m, 2 H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (62,9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  179,14, 163,94, 34,86, 31,74, 25,91; ESI-HRMS  $m/z$  215,05818 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ,  $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_4\text{NaO}_2\text{S}$  calc. 215,25787).

40

#### Ejemplo 3 - Síntesis de mercapto-dPEG<sub>4</sub>-hidracida

Aún en otro modo de realización de trabajo particular, se preparó un conector hidracida-tiol a base de PEG de acuerdo con el esquema 10 para proporcionar una mercapto-dPEG-hidracida.



5

Esquema 10

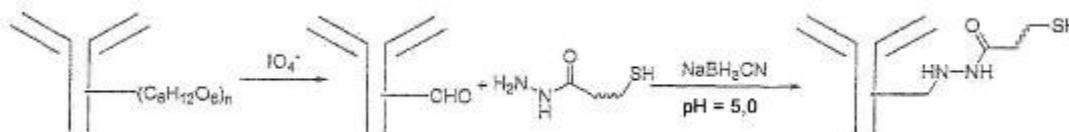
Se añadió lentamente acetil-S-dPEG<sub>4</sub><sup>TM</sup>-éster NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH; 580 mg, 1,38 mmol) a hidracina anhidra (10 ml) y se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Se concentró la reacción a vacío para dar el producto bruto. La cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 199:1 MeCN/AcOH) dio el producto como un aceite incoloro. Rendimiento: 240 mg (59 %); RMN de <sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,04 (s, 1 H), 3,88 (s, 2 H), 3,68-3,52 (m, 17 H), 2,65-2,60 (t, J= 6,3 Hz, 2 H), 2,43-2,39 (t, J= 5,8 Hz, 2 H); RMN de <sup>13</sup>C (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171,94, 72,74, 70,52, 70,49, 70,38, 70,15, 70,09, 66,72, 35,17, 24,12; ESI-HRMS *m/z* 319,13073 (M + Na<sup>+</sup>, C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>S calc. 319,13036). Un acetil-S-dPEG<sub>8</sub><sup>TM</sup>-éster NHS también está disponible comercialmente en Quanta Biodesign, (Powell, OH). En general, una mercapto-dPEG-hidracida puede tener la fórmula H<sub>2</sub>N-NH-CO-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>t</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH, donde t = 2 a 50.

15

#### Ejemplo 4 - Síntesis de conjugados de IgG y fosfatasa alcalina

Se preparó una inmunoglobulina tiolada específicamente de Fc de acuerdo con el esquema 11.

20



25

Esquema 11

Específicamente, 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 2 horas antes de pasarse a través de una columna de desalado PD-10 (NaOAc 0,1 M, EDTA 1 mM, pH = 5,0) para retirar el peryodato en exceso. Se añadió un conector hidracida-tiol (MBH, AMBH, MBCH o mercapto-dPEG4-hidracida) en un exceso molar de 1000 veces al anticuerpo seguido de cianoborohidruro de sodio (3,14 mg, 50 μmol), y se hizo girar la reacción durante un período de 18 h antes de concentrarse hasta un volumen final de 1 ml. La cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; NaOAc 0,1 M, pH = 5,0) dio el anticuerpo tiolado purificado. Se cuantificó el número de tioles a través de un ensayo de Ellman modificado (véase, por ejemplo, Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8). Este procedimiento proporcionó un promedio de 3-5 grupos tiol por anticuerpo.

35

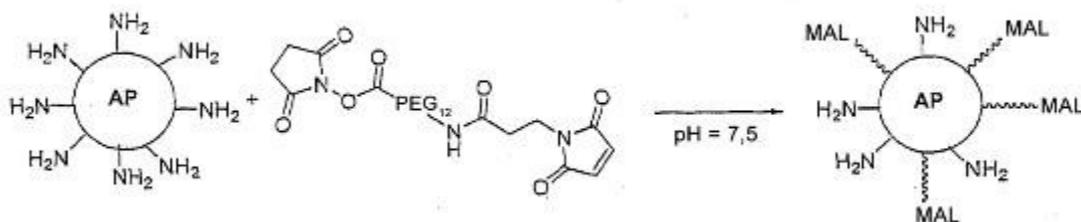
La reacción de un conector hidracida-tiol con un grupo aldehído introducido en la región Fc de una inmunoglobulina se realiza ventajosamente a pH ligeramente ácido, por ejemplo, pH entre 4 y 6 tal como pH cercano a 5. Sin quedar vinculado a ninguna teoría, es probable que a dichos pH ligeramente ácidos el grupo aldehído se active electrófilamente por protonación del oxígeno del aldehído y, al mismo tiempo, el grupo hidracida (pKa de aproximadamente 4) no se protone sustancialmente y se mantenga altamente nucleófilo, facilitando de este modo la reacción entre el grupo aldehído y el grupo hidracida. Puesto que dichas condiciones ligeramente ácidas también representan condiciones donde el azufre del grupo tiol se protona sustancialmente (presente sustancialmente en su forma de ácido neutro) y por tanto no puede reaccionar con los disulfuros que unen las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina, la reacción es fácil y aún es menos probable que altere la estructura de inmunoglobulina.

45

Además, se mantiene un grupo tiol libre para otra reacción para formar un conjugado.

Se introdujeron grupos maleimida reactivos con tiol en fosfatasa alcalina de acuerdo con el esquema 12.

50



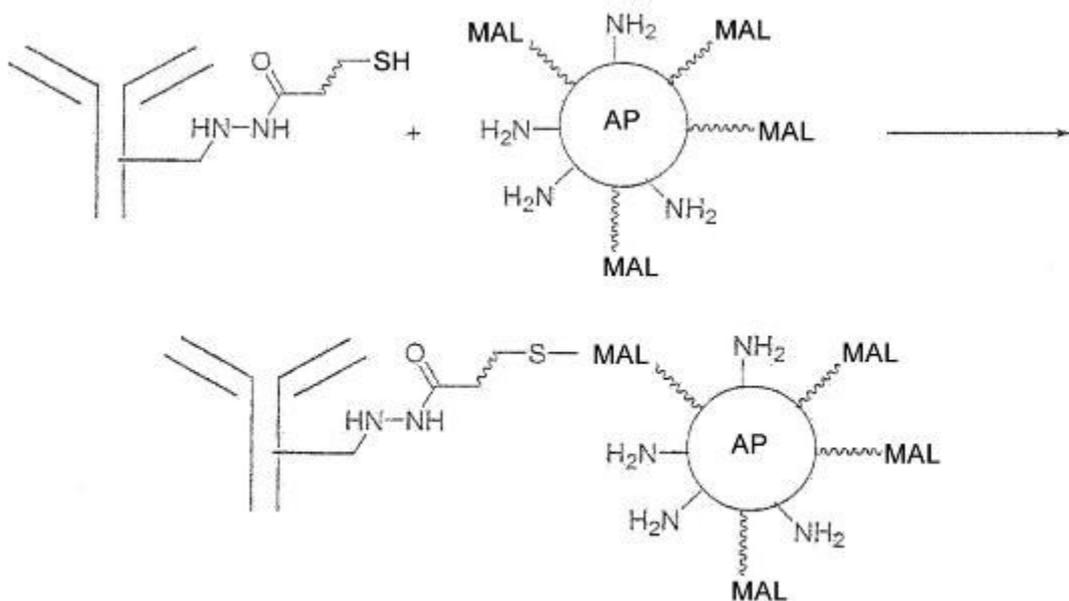
Esquema 12

5 Específicamente, se pasó la fosfatasa alcalina (Biozyme, San Diego, CA), que se recibió en un tampón reactivo que contenía Tris, a través de una columna PD-10 para intercambiar la AP en un tampón no reactivo (fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,1 M, cloruro de magnesio 1 mM, cloruro de cinc 0,1 mM, pH = 7,5). A continuación, a una solución de fosfatasa alcalina (0,8 ml, 17,5 mg/ml) se le añadió un exceso de 100 veces de NHS-dPEG<sub>12</sub>-MAL (Quanta Biotec, Powell, OH) y se hizo girar la reacción durante un período de 1 h. La cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; Tris 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH = 7,5) produjo la fosfatasa maleimido-alcalina purificada.

10 Se cuantificó el número de maleimidias usando un ensayo de Ellman modificado (véase, por ejemplo, Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8), y se introdujeron en promedio 17-25 grupos maleimida en cada enzima fosfatasa alcalina.

15 A continuación se realizó la conjugación final del Ab tiolado y la AP reactiva a un pH superior a 7, que en este caso permitió la formación rápida de un conjugado por reacción del tiol en el Ab (presente en mayor medida en la forma de tiolato base conjugado a mayores pH) y se introdujo el grupo maleimida reactivo con tiol en la fosfatasa alcalina. El esquema 10 a continuación representa la conjugación final del Ab tiolado y la AP reactiva con tiol.

20



Esquema 13

25 Específicamente, se combinó la maleimido-fosfatasa alcalina purificada con el anticuerpo tiolado purificado en una proporción molar 1:1 y se hizo girar durante un período de 18 h. La cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; Tris 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH = 7,5) dio el conjugado purificado que se diluyó a A<sub>280</sub> = 0,0087 en una dilución 1:1 de diluyente estabilizante de enzima AP Stabilzyme™ (SurModics, Eden Prairie, MN) y se analizó en tejido como se describe en los ejemplos que siguen. Los conjugados resultantes mostraron sensibilidades de tinción sin precedentes en una variedad de tejidos, como se muestra en los ejemplos que siguen.

30

La síntesis del conjugado Ab-AP de acuerdo con este procedimiento produce un conjugado 1:1 que tiene una mediana de peso molecular de aproximadamente 270 kDa. Esto es cierto independientemente del anticuerpo usado para preparar el conjugado (tal como anticuerpos anti-IgG de ratón caprino, anti-IgG de conejo caprino y anti-DNP de conejo). Los cromatogramas brutos, obtenidos después de la conjugación, muestran superposición entre producto y material de partida (mediana de peso molecular de 145 kDa), lo que se puede tomar en consideración durante el procedimiento de purificación.

35

**Ejemplo 5 - Detección de Kappa en tejido de amígdala**

5 En este ejemplo, se evaluó el rendimiento de un conjugado Ab-AP preparado usando MBH de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 4 para determinar su sensibilidad de detección en un ensayo de hibridación *in situ* (ISH). Se adaptó el procedimiento utilizado a partir de un protocolo de ISH estándar disponible en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado BenchMark® (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). El protocolo de tinción automatizado fue como sigue.

10 Se calentó una muestra de tejido de amígdala incluida en parafina en un portaobjetos hasta 75 °C durante 4 minutos y se trató dos veces con ajuste de volumen EZPrep™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) a 75 °C antes de la aplicación de LiquidCoverslip™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) con ajuste de volumen EZPrep™. Después de 4 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen EZPrep™ junto con LiquidCoverslip™ para desparafinar el tejido a 76 °C durante 4 minutos. Se distribuyó un cubreobjetos líquido para  
 15 cubrir el EZ-Prep. A continuación se calentó el portaobjetos hasta 90 °C durante 4 minutos y se aclaró antes de enfriar hasta 37 °C. Se añadió ISH-Proteasa 1 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se incubó durante 2 minutos, y a continuación se aclaró, seguido de la adición de una sonda de ácido nucleico kappa marcada con fluoresceína (100 µl, INFORM® Kappa, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Después de una incubación de 4 minutos, se calentó el portaobjetos hasta 85 °C durante 12 minutos, a continuación se enfrió hasta 47 °C y se incubó durante otros 64 minutos. Se aclaró el portaobjetos cuatro veces antes de la adición de un anticuerpo primario anti-fluoresceína de ratón (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), que se incubó durante 20 minutos y a continuación se aclaró dos veces. En este punto se añadió automáticamente un anticuerpo secundario (para  
 20 amplificación adicional) o bien se añadió manualmente o se añadió automáticamente el conjugado Ab-AP desde un distribuidor. Para los portaobjetos que se amplificaron, se añadió un anticuerpo antimurino de conejo (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se incubó durante 8 minutos y a continuación se aclaró el portaobjetos dos veces. En cualquier caso, una vez que se aplicó el conjugado AP-Ab (conjugado anti-IgG murina de conejo o anti-IgG de conejo caprino, para muestras con y sin el anticuerpo secundario, respectivamente; 100 µl) al portaobjetos, se incubó el portaobjetos durante 16 minutos. y se aclaró el portaobjetos dos veces. La aplicación del potenciador iView™ Blue Enhance (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) se siguió de incubación durante 4 minutos y aplicación de tanto iView™ Blue NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) como iView™ Blue BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). BCIP, que es un sustrato de fosfatasa alcalina, genera un precipitado azul oscuro/púrpura insoluble, y NBT potencia el color del BCIP. A continuación se incubó el portaobjetos durante un período de 32 minutos, se aclaró dos veces y se añadió contratinción (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Después de la incubación con la contratinción durante 6 minutos, se aclaró de nuevo el portaobjetos y se retiró  
 25 del instrumento. Se trató el portaobjetos con un lavado de detergente antes de la deshidratación con la serie de etanol, acetona y a continuación xileno. Se añadió un cubreobjetos al portaobjetos y se vio y se fotografió el portaobjetos a través de un microscopio. También se preparó un portaobjetos de control negativo que no se trató con la sonda kappa de forma similar.

40 A modo de comparación, se tiñó una muestra de tejido de amígdala de referencia usando un procedimiento similar que emplea un conjugado SA-AP para la detección de la sonda kappa (el procedimiento incluyó la adición del anticuerpo secundario como anteriormente seguido de etapas de amplificación adicionales, en el que se realizó una adición automatizada de un anticuerpo anti-IgG biotinilado en lugar de la aplicación del conjugado Ab-AP, que a continuación se siguió de la adición del conjugado SA-AP). El uso de anticuerpos marcados con biotina y conjugados SA-AP es un estándar industrial para la detección en procedimientos de tinción de ISH automatizada y sirvió como referencia sobre la que determinar el rendimiento relativo del conjugado Ab-AP. También se preparó un portaobjetos de control negativo que no se trató con la sonda kappa de forma similar usando detección SA-AP. Se añadieron cubreobjetos a los portaobjetos y se vieron y se fotografiaron los portaobjetos a 40X a través de un microscopio de campo claro.

50 La FIG 1 es un conjunto de fotomicrografías que comparan la tinción deseada y la tinción de fondo observadas para la detección de ISH kappa en tejido de amígdala usando el conjugado anticuerpo-fosfatasa alcalina y el conjugado SA-AP. En la FIG. 1A se muestra la tinción de kappa sin amplificación proporcionada por el anticuerpo secundario y usando el conjugado de anticuerpo divulgado. La FIG. 1B muestra un portaobjetos de control negativo tratado con el conjugado. La FIG. 1C muestra la tinción de kappa usando el SA-AP, y la FIG. 1D muestra el control negativo para el mismo. Una comparación de las FIGS. 1A y 1C demuestra una tinción más definida por el conjugado de anticuerpo (aunque se usaron menos etapas de amplificación), y una comparación de las FIGS. 1B y 1D demuestra el menor fondo proporcionado por el conjugado de anticuerpo. Estos resultados ilustran la superioridad del esquema de detección sin biotina permitido por el conjugado de anticuerpo.

**Ejemplo 6 - Detección de Lambda en tejido de amígdala**

65 El procedimiento de tinción automatizado descrito en el ejemplo 5 (con las excepciones de que la sonda de ácido nucleico marcada con fluoresceína usada fue específica para Lambda; INFORM® Lambda, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, e ISH-proteasa 1 se incubó durante 4 minutos) se usó para evaluar el rendimiento de un conjugado Ab-AP para la detección de Lambda en tejido de amígdala. Se usó el conjugado Ab-AP sin una etapa de amplificación

de anticuerpo secundario y se preparó usando MBH como se describe en el ejemplo 4. Para la comparación, se preparó un portaobjetos de referencia usando el esquema de detección de conjugado SA-AP descrito en el ejemplo 4.

5 Los resultados se presentan en la FIG. 2. Específicamente, las FIGS. 2A y 2B muestran el patrón de tinción obtenido usando el conjugado Ab-AP con y sin (control negativo) la adición de la sonda de ácido nucleico específica de Lambda, respectivamente. Las FIGS. 2C y 2D muestran el patrón de tinción obtenido usando el conjugado SA-AP con y sin (control negativo) la adición de la sonda Lambda, respectivamente. Una comparación de las FIGS. 2A y 2C muestra que el patrón de tinción obtenido usando el conjugado Ab-AP es al menos tan intenso como el observado con el conjugado SA-AP, a pesar del procedimiento usado para el conjugado Ab-AP que implica un etapa de amplificación menos. Una comparación de las FIGS. 2B y 2D demuestra que existe mucha menos tinción de fondo (evidenciada por una tinción global más oscura del tejido) por el conjugado Ab-AP. De nuevo, estos resultados demuestran la reducción ventajosa del fondo observada cuando se emplea el conjugado Ab-AP divulgado.

#### 15 **Ejemplo 7 - Detección de CMV en tejido pulmonar**

El procedimiento de tinción automatizado descrito en el ejemplo 5 (con las excepciones de que la sonda de ácido nucleico marcada con fluoresceína usada fue específica para CMV; INFORM<sup>®</sup> CMV, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, e ISH-proteasa 1 se incubó durante 4 minutos) se usó para evaluar el rendimiento de un conjugado Ab-AP para la detección de CMV en tejido pulmonar. Se usó el conjugado Ab-AP sin una etapa de amplificación de anticuerpo secundario y se preparó usando MBH como se describe en el ejemplo 4. Para la comparación, se preparó un portaobjetos de referencia usando el esquema de detección de conjugado SA-AP descrito en el ejemplo 4.

25 Los resultados se presentan en la FIG. 3. Específicamente, la FIG. 3A muestra el patrón de tinción obtenido usando el conjugado Ab-AP en presencia de la sonda, la FIG. 3B muestra el patrón de tinción obtenido usando el conjugado Ab-AP en ausencia de la sonda, la FIG. 3C muestra el patrón de tinción obtenido usando el conjugado SA-AP en presencia de la sonda, y la FIG. 3D muestra el patrón de tinción usando el SA-AP conjugado en ausencia de la sonda. Una comparación de la FIG. 3A y 3C muestra que la tinción con el conjugado Ab-AP es más definida que y al menos tan intensa (a pesar de tener un etapa de amplificación menos) como la tinción proporcionada por el conjugado SA-AP. Además, se observa menos tinción de fondo para el conjugado Ab-AP. La reducción en el fondo proporcionada por el conjugado Ab-AP también es evidente de una comparación de las FIGS. 3B y 3D.

#### **Ejemplo 8 - Detección de EBER en tejido de bazo**

35 El procedimiento de tinción automatizado descrito en el ejemplo 5 (con las excepciones de que la sonda de ácido nucleico marcada con fluoresceína usada fue específica para EBER; INFORM<sup>®</sup> EBER, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, e ISH-proteasa 1 se incubó durante 4 minutos) se usó para evaluar el rendimiento de un conjugado Ab-AP para la detección de EBER en tejido de bazo. Se usó el conjugado Ab-AP sin una etapa de amplificación de anticuerpo secundario y se preparó usando MBH como se describe en el ejemplo 4. Para la comparación, se preparó un portaobjetos de referencia usando el esquema de detección de conjugado SA-AP descrito en el ejemplo 4.

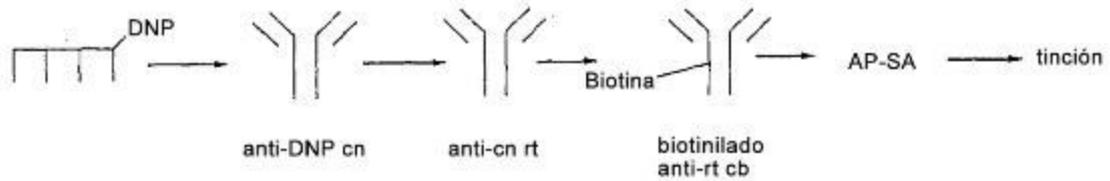
45 Los resultados se presentan en la FIG. 4. Específicamente, la FIG. 4A muestra el patrón de tinción obtenido usando el conjugado Ab-AP en presencia de la sonda, la FIG. 4B muestra el patrón de tinción obtenido usando el conjugado Ab-AP en ausencia de la sonda, la FIG. 4C muestra el patrón de tinción obtenido usando el conjugado SA-AP en presencia de la sonda, y la FIG. 4D muestra el patrón de tinción usando el SA-AP conjugado en ausencia de la sonda. Una comparación de la FIG. 4A y 4C muestra que la tinción con el conjugado Ab-AP es más definida que y al menos tan intensa (a pesar de tener un etapa de amplificación menos) como la tinción proporcionada por el conjugado SA-AP. Además, se observa menos tinción de fondo para el conjugado Ab-AP. La reducción en el fondo proporcionada por el conjugado Ab-AP también es evidente de una comparación de las FIGS. 3B y 3D.

#### **Ejemplo 9 - Detección de PVH en xenoinjertos de tejido**

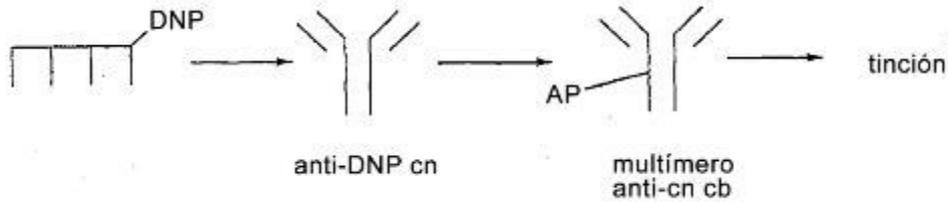
55 En este ejemplo, se evaluó el rendimiento de un conjugado Ab-AP que se preparó usando MBH de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 4, en parte, para determinar si proporcionaba suficiente sensibilidad para permitir otra reducción en el número de etapas necesarias para detectar secuencias de PVH por ISH. Los resultados muestran que es posible lograr una reducción en el número de etapas necesarias para la detección, haciendo de este modo que el conjugado Ab-AP divulgado sea muy útil para un procedimiento automatizado donde una reducción en el número de etapas da lugar a una reducción significativa en el tiempo de procesamiento y simultáneamente, en el coste de ensayo.

60 Los tres esquemas de detección presentados a continuación como esquemas 14-16, se realizaron de forma automatizada o semiautomatizada. En cada uno de estos esquemas, en primer lugar se añade a la muestra una sonda de ácido nucleico marcada con DNP que se une específicamente a al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico de PVH. Las etapas posteriores representadas en estos esquemas son etapas usadas para detectar la presencia de la sonda unida al ácido nucleico de PVH.

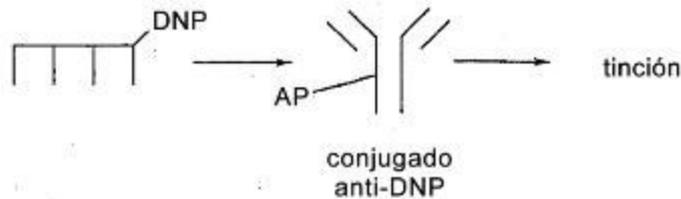
65



Esquema 14



Esquema 15



Esquema 16

En el esquema 14, en primer lugar se une un anticuerpo anti-DNP a la sonda. A continuación se añade un anticuerpo anti-IgG (primer etapa de amplificación). En una segunda etapa de amplificación, se añade un anticuerpo anti-IgG biotinilado. Se añade un conjugado SA-AP, que se une al anticuerpo biotinilado, y se logra la tinción a través de la adición de un sustrato cromógeno sobre el que AP actúa. En el esquema 15, se elimina la segunda etapa de amplificación, y se añade un anticuerpo anti-IgG conjugado con AP antes de la tinción en lugar de un conjugado SA-AP. En el esquema 16, se eliminan ambas etapas de amplificación y se detecta directamente la sonda marcada con DNP por un anticuerpo anti-DNP conjugado con AP.

Se realizó la detección de PVH en una variedad de líneas celulares cultivadas en xenoinjertos en ratones SCID de acuerdo con el siguiente procedimiento adaptado de un protocolo de ISH estándar para el instrumento de tinción automatizado BenchMark® (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Se calentó tejido incluido en parafina en un portaobjetos hasta 75 °C durante 4 minutos y a continuación se trató dos veces con ajuste de volumen EZPrep™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) a 75 °C antes de la aplicación de Liquid Coverslip™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) con ajuste de volumen EZPrep™. Después de 4 minutos a 75 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen EZPrep™ para desparafinar el tejido a 76 °C durante 4 minutos. Se distribuyó un cubreobjetos líquido para cubrir el EZPrep™. Se añadió solución de acondicionamiento celular Cell Conditioner n.º 2 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se calentó el portaobjetos hasta 90 °C y se incubó durante 8 minutos. Esto se siguió de otra aplicación de Cell Conditioner n.º 2 y aún otra incubación a 90 °C durante 12 minutos. Se aclaró el portaobjetos con tampón de reacción (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), se enfrió hasta 37 °C y se añadió ISH-proteasa 3 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Después de una incubación de 4 minutos, se aclaró el portaobjetos tres veces antes de la aplicación de un tampón de hibridación (solución iView™ más HybReady™, 100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y se incubó durante 4 minutos. La adición de una sonda de ácido nucleico de PVH marcada con DNP (HPV HR Probe, 200 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) 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 a continuación, dependiendo del esquema de detección seguido, se trataron dichos portaobjetos de forma automatizada o semiautomatizada de una de tres maneras.

En un caso, como se representa en el esquema 14, se aplicó iView™ + anticuerpo primario anti-DNP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ), y se incubó durante 20 minutos. A continuación se aclaró el portaobjetos dos veces antes de la adición del anticuerpo secundario iView™ + Amp (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). La incubación del conjugado se produjo durante 8 minutos antes de aclarar el portaobjetos. La adición de iVIEW™

+ biotina-Ig (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) se siguió de una incubación de 12 minutos y adición del iVIEW™ + SA-AP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Se aclaró el portaobjetos tres veces antes de la aplicación del iView™ + potenciador (100 µl, VMSI), que se siguió de incubación durante 4 minutos y aplicación de tanto iView™ + NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) como iView™ + BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). A continuación se incubó el portaobjetos durante un período de 24 minutos, se aclaró tres veces y se añadió contratinción (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). 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 lavado con detergente antes de la deshidratación con una serie de etanol, acetona y a continuación xileno. Se aplicó un cubreobjetos al portaobjetos y a continuación se vio y se fotografió a través de un microscopio de campo claro.

En otro caso, como se representa en el esquema 15, se añadió un anticuerpo primario anti-DNP de conejo (iView™ más anticuerpo primario anti-DNP, 100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Se incubó el anticuerpo primario durante 20 minutos y a continuación se aclaró el portaobjetos dos veces antes de la adición manual (esta etapa también se puede automatizar para hacer el procedimiento totalmente automatizado) del anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (100 µl). La incubación del conjugado se produjo durante 16 minutos antes de aclarar el portaobjetos cuatro veces. La aplicación del iView™ más potenciador (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) se siguió de incubación durante 4 minutos y aplicación de tanto NBT como BCIP para el desarrollo del color (iView™ más NBT e iView™ más BCIP, 100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). A continuación se incubó el portaobjetos durante un período de 24 minutos, se aclaró tres veces y se añadió contratinción (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). 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 con detergente antes de la deshidratación con etanol, acetona y xileno. Después de la aplicación de un cubreobjetos, se vio el portaobjetos a través de un microscopio y se fotografió a 40X usando un microscopio de campo claro.

Aún en otro caso, como se representa en el esquema 16, se trató el portaobjetos directamente con un conjugado a-DNP de conejo-fosfatasa alcalina (100 µl). Se incubó el portaobjetos durante 20 minutos y a continuación se aclaró dos veces antes de la aplicación del iView™ + potenciador (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Esto se siguió de la incubación durante 4 minutos y aplicación simultánea de iView™ + NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) e iView™ + BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). A continuación se incubó el portaobjetos durante un período de 24 minutos, se aclaró tres veces y se añadió contratinción (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). 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 con detergente antes de la deshidratación en serie con etanol, acetona y xileno. Se añadió un cubreobjetos al portaobjetos y se vio y se fotografió a 40X con un microscopio de campo claro.

Las FIGS. 5-7 muestran los resultados de la detección de PVH en tres tipos de tejido de xenoinjerto diferentes. En las FIGS. 5A, 5B y 5C, se muestran los patrones de tinción para la detección de PVH en tejido de xenoinjerto de CaSki de acuerdo con cada uno de los esquemas 14, 15 y 16, respectivamente. En las FIGS. 6A, 6B y 6C, se muestran los patrones de tinción para la detección de PVH en tejido de xenoinjerto de HeLa de acuerdo con cada uno de los esquemas 14, 15 y 16, respectivamente. En las FIGS. 7A y 7B, se muestran los patrones de tinción para la detección de PVH de copia única (indicada por flechas) en tejido de xenoinjerto de SiHa de acuerdo con cada uno de los esquemas 14 y 15, respectivamente.

Una comparación de las FIGS 5A y 5B demuestra que la intensidad de tinción proporcionada por la detección de acuerdo con el esquema 15 es mayor que la proporcionada de acuerdo con el esquema 14 aunque el esquema 15 incluye dos etapas de amplificación menos. La FIG. 5C demuestra que la detección de PVH se puede lograr sin amplificación usando detección directa (esquema 16) con un conjugado Ab-AP preparado de acuerdo con el ejemplo 4. Una comparación de las FIGS 6A y 6B también demuestra que la intensidad de tinción proporcionada por la detección de acuerdo con el esquema 15 es mayor que la proporcionada de acuerdo con el esquema 14, aunque el esquema 15 incluye dos etapas de amplificación menos. La FIG. 6C demuestra que la detección de PVH se puede lograr sin amplificación usando detección directa (esquema 16) con un conjugado Ab-AP preparado de acuerdo con el ejemplo 4. Una comparación de las FIGS. 7A y 7B muestra que se pueden detectar incluso copias únicas de secuencias de ácido nucleico de PVH con el procedimiento de detección del esquema 15. En general, los resultados demuestran que la sensibilidad superior presentada por un Ab-AP específico de Fc divulgado facilita la detección automatizada reduciendo el número de etapas necesarias para detectar PVH en muestras de tejido. La reducción del número de etapas entre los esquemas 14 y 15 puede reducir el tiempo de procedimiento de tinción automatizado total en un 15 % (de 6,5 h a 5,5 h). Se pueden lograr otras reducciones en el tiempo de procedimiento por el uso del esquema 16.

Aunque en este ejemplo se describieron una sonda marcada con DNP y tipos específicos de anticuerpos, un experto en la técnica apreciará que se pueden usar muchos otros haptenos (tales como fluoresceína, digoxigenina y biotina) para marcar secuencias de ácido nucleico y que el uso de múltiples sondas de ácido nucleico para diferentes dianas, teniendo cada una un marcador de hapteno diferente, se puede usar para permitir la detección multiplexada (tal como con diferentes anticuerpos de detección conjugados con diferentes nanopartículas fluorescentes que emiten luz de diversas longitudes de onda diferentes). Además, un experto en la técnica reconocerá que se pueden usar anticuerpos

de otros tipos y de otras especies diferentes a lo descrito, otros marcadores detectables y otros reactivos para generar una señal detectable en ensayos similares para detectar otras dianas.

#### **Ejemplo 10 - Detección de PVH en preparaciones a base de líquido**

Se prepararon portaobjetos para el ensayo de PVH de preparación a base de líquido usando el sistema de preparación de portaobjetos ThinPrep® 2000 System (Cytoc Corporation, Marlborough, MA). Se colocan células obtenidas a través de raspado vaginal dentro de una solución conservante tamponada a base de metanol (ThinPrep® PreservCyt Solution, Cytoc Corporation, Marlborough, MA) y después se corta en capas sobre el portaobjetos de vidrio por el instrumento.

El siguiente es un procedimiento adaptado del instrumento Ventana BenchMark®: se calentó el portaobjetos de preparación a base de líquido hasta 65 °C durante 12 minutos seguido de 4 minutos adicionales a 75 °C y se aclaró dos veces con tampón de reacción (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ; 1.2 ml) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). A continuación se aclaró el portaobjetos con 0,9 ml de tampón de aclarado (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) seguido de la aplicación de la solución de acondicionamiento celular Cell Conditioner n.º 2 (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) y se calentó el portaobjetos a 90 °C y se incubó durante 16 minutos. Se aclaró el portaobjetos con tampón de reacción, se enfrió hasta 37 °C y se añadió ISH-proteasa 3 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Después de una incubación de 4 minutos, se aclaró el portaobjetos tres veces antes de la aplicación iView™+ HybReady (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) que se incubó durante 4 minutos. La adición de la sonda VPH HR (200 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) 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, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ).

Para la detección de SA-AP estándar (de acuerdo con el esquema 14 anterior), se incubó el anticuerpo primario durante 20 minutos y a continuación se aclaró el portaobjetos dos veces antes de la adición del anticuerpo secundario iVIEW™ + Amp (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ, 100 µl). La incubación del anticuerpo se produjo durante 8 minutos antes de aclarar. A continuación, se añadió el iVIEW™+ conjugado anticuerpo anti-IgG-biotina (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ, 100 µl) seguido de una incubación de 12 minutos y etapa de aclarado. Finalmente, se añadió el iVIEW™ + conjugado SA-AP (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ, 100 µl) y después de una incubación de 8 minutos, se aclaró el portaobjetos tres veces con tampón de reacción. Para la detección usando el conjugado Ab-AP como anticuerpo secundario (de acuerdo con el esquema 15 anterior), se incubó el anticuerpo primario durante 20 minutos y a continuación se aclaró el portaobjetos dos veces antes de la adición del conjugado AP-IgG (100 µl). La incubación del conjugado se produjo durante 8 minutos antes de aclarar tres veces con tampón de reacción. Para la detección directa de la sonda marcada usando el conjugado Ab-AP, se incubó el conjugado durante 20 minutos antes de aclarar el portaobjetos tres veces con tampón de reacción.

En los tres casos, las etapas anteriores se siguieron de la aplicación de iVIEW™ + potenciador (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) se siguió de incubación durante 4 minutos y aplicación de tanto iVIEW™+ NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) como iVIEW™+ BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). A continuación se incubó el portaobjetos durante un período de 24 minutos, se aclaró tres veces y se añadió contratinción (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). 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 con 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.

Una comparación de las FIGS. 8A y 8B muestra que la detección de acuerdo con el esquema 15 (véase el ejemplo 9), usando un conjugado Ab-AP que se preparó usando MBH de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 4, proporciona una tinción más intensa que la proporcionada por la detección usando un conjugado SA-AP de acuerdo con el esquema 14 (véase el ejemplo 9). Una comparación de las FIGS. 8B y 8C demuestra que la detección directa usando un conjugado Ab anti-DNP-AP de acuerdo con el esquema 16 (véase el ejemplo 9) proporciona una señal que es comparable a la señal proporcionada por un conjugado SA-AP de acuerdo con el esquema 14. Estos resultados demuestran de nuevo que la sensibilidad de detección proporcionada por un conjugado Ab-AP específico de Fc de acuerdo con el ejemplo 4 permite una reducción en el número de etapas necesarias para proporcionar señales adecuadas, facilitando de este modo la automatización.

#### **Ejemplo 11 - Detección de actina en tejido muscular**

En este ejemplo, la detección inmunohistoquímica de una diana proteica (actina) usando un conjugado Ab-AP preparado como se describe en el ejemplo 4 con un conector MBH se comparó con el rendimiento de un conjugado SA-AP.

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™ (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) a 75 °C antes de la aplicación del cubreobjetos líquido (Ventana Medical

Systems, Inc, Tucson, AZ) con ajuste de volumen EZPrep™. Después de otros 4 minutos a 76 °C, se aclaró el portaobjetos y se añadió ajuste de volumen Depar (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) junto con un cubreobjetos líquido para desparafinar el tejido. A continuación se enfrió el portaobjetos a 42 °C durante 2 minutos, antes de alcanzar la temperatura final de 37 °C. A continuación se añadió el anticuerpo primario (100 µl, anti-actina muscular, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) y se incubó el portaobjetos a 37 °C durante 16 minutos. A continuación se aclaró el portaobjetos dos veces y se añadió el material anti-IgG de ratón caprino conjugado con fosfatasa alcalina (100 µl) y se incubó a 37 °C durante 16 minutos. Se aclaró el portaobjetos una vez antes de la adición simultánea del potenciador Enhanced V-Red (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) y Enhance Naphthol (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ), y se incubó el portaobjetos de nuevo a 37 °C durante 4 minutos. Esto se siguió de la adición de Enhance Fast Red A (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) una incubación de 8 minutos y la adición de Enhance Fast Red B (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ) con una incubación final de 8 minutos. Después del desarrollo de la tinción, se trató el portaobjetos con un lavado con 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.

Los resultados se presentan en la FIG. 9. Específicamente, la FIG. 9A muestra que la detección usando el conjugado Ab-AP y una única etapa de amplificación es superior a la detección usando un conjugado SA-AP y dos etapas de amplificación (FIG. 9B). Estos resultados demuestran de nuevo la sensibilidad de detección superior proporcionada por los conjugados de anticuerpos específicos de Fc de acuerdo con la divulgación.

#### Ejemplo 12 - Variación de longitud y tipo de conector de anticuerpo

En este ejemplo, se determinó el efecto de la longitud y tipo de conector sobre la composición del conjugado y las características de tinción. Se prepararon varios conjugados de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 4, pero usando una variedad de conectores hidracida-tiol, específicamente, conjugados preparados usando un conector tio-PEG<sub>4</sub>-hidracida, un conector ácido mercaptobutírico-hidracida (MBH) y un conector ácido mercaptobutírico-carbohidracida (MBCH). Estos conjugados se compararon entre sí y con un conjugado preparado por la generación de tioles por reducción de disulfuros de inmunoglobulina, específicamente un conjugado Ab-AP preparado por el procedimiento descrito en la solicitud de patente provisional de EE. UU. pendiente de trámite n.º 60/675759 que implica la generación de tioles por medio de reducción con DTT seguido de conjugaciones usando un conector bifuncional maleimida-NHS a base de PEG. También para la comparación, se usó un conector ácido acetamidomercaptobutírico-hidracida disponible comercialmente (AMBH, Invitrogen, Eugene, OR) en el procedimiento del ejemplo 4 para generar un conjugado Ab-AP. Además, se preparó un conjugado Ab-AP preparado con una maleimido-hidracida (EMCH; N[ácido ε-maleimidocaproico]hidracida, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) usando las instrucciones del fabricante y se usó en el protocolo de tinción para la comparación. Además, se usó el procedimiento de conjugación específico de Fc descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.191.066 que emplea cistamina para proporcionar el conjugado Ab-AP específico de Fc para la comparación.

Los resultados del ensayo de Ellman mostraron que se añadieron entre 3-5 tioles/Ab a una inmunoglobulina a través de la adición con los conectores hidracida-tiol a base de MBH y PEG, 5-7 tioles/Ab para los conectores AMBH y MBCH, y 8-12 tioles/Ab para el procedimiento de reducción con TDT. Después del acoplamiento de los tioles introducidos o generados en la inmunoglobulina a AP derivatizada con maleimida, se obtuvieron cromatogramas de exclusión por tamaño.

Se obtuvieron cromatogramas de exclusión por tamaño usando un AKTA Purifier-CL (GE Biosciences, Uppsala, Suecia) usando una columna Superdex 10/300 200 GL y Tris 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH = 7,5 como la fase móvil. El caudal se mantuvo a 1 ml/min en todos los casos. De los cromatogramas de exclusión por tamaño, se determinó que el mejor rendimiento de conjugado se obtuvo usando AMBH. Sin embargo, comenzó a separarse por precipitación de la solución cuando se almacenó a 2-8 °C durante 48 horas. Los otros conectores proporcionaron conjugados que tenían perfiles de exclusión por tamaño similares.

La FIG. 10 compara la tinción como se explica en el ejemplo 6 de Kappa en tejido de amígdala usando los conjugados como anticuerpo secundario. La FIG. 10A muestra el patrón de tinción visto para un conjugado Ab-AP preparado con EMCH. La FIG. 10B muestra el patrón de tinción visto para el procedimiento de cistamina específico de Fc de la patente de EE. UU. n.º 5.191.066. La FIG. 10C muestra el patrón de tinción visto para el conjugado Ab-AP preparado por un procedimiento de reducción con DTT de acuerdo con la solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/413.418, presentada el 27 de abril de 2006, que utilizó un conector bifuncional a base de dPEG. La FIG. 10D muestra el patrón de tinción visto para el conjugado Ab-AP preparado con el conector AMBH disponible comercialmente usando el procedimiento divulgado de conjugación específica de Fc. La FIG. 10E muestra el patrón de tinción visto para el conjugado Ab-AP preparado de acuerdo con el procedimiento de conjugación específico de Fc divulgado que emplea el conector MBH divulgado del ejemplo 1. La FIG 10F muestra el patrón de tinción visto para el conjugado Ab-AP preparado de acuerdo con el procedimiento de conjugación específico de Fc divulgado que emplea el conector dPEG<sub>4</sub>-hidracida-tiol divulgado del ejemplo 3. La FIG. 10G muestra el patrón de tinción visto para el conjugado Ab-AP preparado de acuerdo con el procedimiento de conjugación específico de Fc divulgado que emplea el conector MBCH-hidracida-tiol divulgado del ejemplo 2. Una comparación de los patrones de tinción revela la siguiente tendencia para la intensidad de tinción proporcionada por los conjugados:

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

5 Las imágenes ilustran la sensibilidad superior que se puede lograr por la conjugación específica de Fc de enzimas usando el procedimiento divulgado y diversos conectores hidracida-tiol divulgados y disponibles comercialmente. El procedimiento divulgado también proporciona conjugados superiores al procedimiento específico de cistamina Fc y acoplamiento con EMCH. Solo el procedimiento de conjugación mediado por TDT proporciona conjugados que dan especificidad y sensibilidad similares.

#### 10 **Ejemplo 13 - Variación del exceso de conector MBH**

15 En este ejemplo, se determinó la dependencia de la composición y características de tinción del conjugado con el exceso de conector hidracida-tiol. La síntesis de conjugados AP-IgG con el conector MBH se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del ejemplo 4, sin embargo, el exceso molar del conector MBH se varió de un exceso de cinco mil veces a un exceso de cincuenta veces. Los resultados del ensayo de Ellman mostraron el siguiente número de tios/Ab: 5000x - 9-15; 1000x - 7-10; 500x-3-5; 100x - 2-4; 50x - 1-3. El análisis de los conjugados (5000x, 1000x, 500x, 100x y 50x) después de la reacción con el Ab derivatizado con maleimida se realizó por cromatografía de exclusión por tamaño y mostró que los conjugados sintetizados usando un exceso mayor de conector tuvieron un rendimiento global mayor. Sin embargo, la tinción de tejido (anti-actina muscular de ratón; anti-S100 de piel de conejo) para cada uno de estos conjugados mostró que el 500x tuvo la tinción más intensa con la menor cantidad de fondo.

#### 20 **Ejemplo 14 - Variación de longitud/tipo de conector de fosfatasa alcalina**

25 En este ejemplo, se determinó la dependencia de la composición y características de tinción del conjugado con la longitud y tipo de conector usado para añadir grupos reactivos con tiol a la fosfatasa alcalina. La síntesis de conjugados AP-IgG con el conector MBH se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del ejemplo 4, pero se usaron los siguientes conectores para activar la fosfatasa alcalina para la reacción con el anticuerpo tiolado: LC-SMCC (Pierce, Rockford, IL), MAL-dPEG<sub>8</sub>-éster NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH), MAL-dPEG<sub>4</sub>-éster NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH) y MAL-dPEG<sub>12</sub>-éster NHS (Quanta Biodesign, Powell, OH). Cada uno de estos conectores se hizo reaccionar con AP en un exceso de cien veces, en un sistema tampón (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH = 7,5) durante 1 hora. El LC-SMCC se tuvo que disolver en dimetilformamida (DMF) y añadir a la AP, pero sin exceder un 10 % del volumen total de DMF en el tampón. El ensayo de Ellman mostró una incorporación de maleimida de 20/AP para los conectores PEG<sub>12</sub> y LC-SMCC, 27/AP para el conector PEG<sub>8</sub> y 30/AP para el conector PEG<sub>4</sub>. Después de acoplar a un anticuerpo tiolado de Fc (preparado con MBH), se obtuvieron cromatogramas de exclusión por tamaño tras la purificación. El conector PEG<sub>12</sub> dio el mayor rendimiento de conjugado, seguido de los conectores PEG<sub>8</sub>, LC-SMCC y PEG<sub>4</sub>. La tinción de tejido (anti-actina muscular de ratón; anti-S100 de piel de conejo) reflejó el rendimiento del conjugado, dando el conjugado PEG<sub>12</sub> la tinción más intensa.

#### 35 **Ejemplo 15 - Variación del exceso de conector NHS-PEG<sub>12</sub>-MAL**

40 En este ejemplo, se determinó la dependencia de la composición y características de tinción del conjugado con el exceso de conector NHS-PEG<sub>12</sub>-MAL usado para añadir grupos reactivos con tiol a la fosfatasa alcalina. Se realizaron síntesis de conjugados AP-IgG de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 4 donde se varió el exceso molar de un conector MAL-dPEG<sub>12</sub>-éster NHS de un exceso de quinientas veces a un exceso de veinticinco veces.

45 Los resultados del ensayo de Ellman mostraron la incorporación de maleimida de: 500x - 34 maleimidias; 250x - 29 maleimidias; 100x - 18-20 maleimidias; 50x - 17 maleimidias; 25x - 15 maleimidias. El análisis de los conjugados (500x, 250x, 100x, 50x y 25x), después de la reacción con el Ab tiolado de Fc, usando cromatografía de exclusión por tamaño mostró que los conjugados sintetizados usando un exceso mayor de conector tuvieron un rendimiento mayor y un porcentaje mayor de incorporación de maleimida. La tinción de tejido (anti-actina muscular de ratón; anti-S100 de piel de conejo) para cada uno de los conjugados mostró que el uso de maleimida 100x dio la tinción más pronunciada e intensa.

#### 50 **Ejemplo 16 - Variación de proporciones molares AP/Ab**

55 En este ejemplo, se determinó la dependencia de la composición y características de tinción del conjugado con la proporción del anticuerpo tiolado (preparado con un conector MBH) con respecto a AP derivada de maleimida (conector NHS-PEG<sub>12</sub>-MAL) en la reacción final. Se usaron las siguientes proporciones (anticuerpo/AP): 2:1, 1:1, 1:2 y 1:3. Los perfiles de los cromatógrafos de exclusión por tamaño mostraron que se obtuvo el rendimiento máximo cuando la proporción molar fue de 2 AP:1 Ab. Sin embargo, la tinción de tejido de los conjugados (anti-actina muscular de ratón; anti-S100 de piel de conejo) demostró que la mejor proporción señal/ruido se observó con el conjugado 1:1.

#### 60 **Ejemplo 17 - Síntesis de AP reticulada**

65 La fosfatasa alcalina es una proteína dimerica, y su estabilidad se puede incrementar por reticulación de la enzima para ayudar a evitar la disociación del dímero. La fosfatasa alcalina se reticuló usando el siguiente procedimiento. Se

intercambió fosfatasa alcalina (Biozyme, San Diego, CA; 17,5 mg, 0,125  $\mu$ mol) en un tampón diferente del que se recibió (fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,1 M, cloruro de magnesio 1,0 mM, cloruro de cinc 0,1 mM, pH = 7,5) y se añadió a dextrano activado con aldehído preoxidado reconstituido (Prom. de peso molecular 40,000; Pierce Biotechnologies, Rockford, IL; 5 mg, 0,125  $\mu$ mol) en presencia de cianoborohidruro de sodio (1,6 mg, 25  $\mu$ mol). A continuación se hizo girar la mezcla de reacción durante un período de una hora a temperatura ambiente. Se extinguieron los aldehídos en exceso por etanolamina (151  $\mu$ l, 2,5 mmol) seguido de la adición de más cianoborohidruro de sodio (157,1 mg, 2,5 mmol). Se hizo girar la mezcla de reacción durante una hora adicional. Se aisló la AP reticulada por cromatografía de exclusión por tamaño usando un Akta Purifier (GE Biosciences, Uppsala, Suecia) equipado con una columna Superdex 200 GL 10/300 (GE Biosciences, Uppsala, Suecia). El caudal fue de 1 ml/min y la fase móvil acuosa fue fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,1 M, cloruro de magnesio 1,0 mM, cloruro de cinc 0,1 mM, a pH = 7,5. Se cuantificó el número de aminas restantes después de la reacción usando un ensayo de fluoraldehído (Protein Assay Technical Handbook, Pierce Biotechnology, Rockford, IL), y en promedio 8-12 aminas permanecieron después de la reticulación. La AP reticulada se unió a MAL-dPEG<sub>12</sub>-éster NHS (que se hizo reaccionar con las aminas restantes) y se conjugó con un anticuerpo tiolado de Fc como se describe en el ejemplo 4 para generar un conjugado que incluye una enzima AP reticulada. Los estudios de estabilidad mostraron que la reticulación mejoró la estabilidad del conjugado en un diluyente que contiene avidina (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ; P/N 95130). Específicamente, a 45 °C, la pérdida total de intensidad de tinción el 3.<sup>er</sup> día para el conjugado con la AP reticulada fue de un 50 %, mientras que en el mismo diluyente y a la temperatura, un conjugado preparado con una AP no reticulada perdió un 95 % de su intensidad de tinción el 1.<sup>er</sup> día.

Los procedimientos alternativos para reticular AP para incrementar su estabilidad se proporcionan en Bieniarz *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 9: 390-398, 1998, Bieniarz *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 9: 399-402, 1998, y patente de EE. UU. n.º 5.789.219. Estos procedimientos también se pueden usar para reticular enzimas fosfatasa alcalina para su uso en un conjugado divulgado.

#### Ejemplo 18 - SDS PAGE analítica de conjugados de fosfatasa alcalina

En este ejemplo, la especificidad de Fc del procedimiento de conjugación del ejemplo 4 se demuestra por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se analizaron seis preparaciones diferentes del conjugado, 3 preparadas con un anticuerpo anti-IgG de ratón y 3 preparadas con un anticuerpo anti-IgG de conejo. En resumen, se mezclaron de cinco a 20  $\mu$ l de una solución de 100-200 ng por  $\mu$ l de cada conjugado con tampón de carga de gel LDS 4X (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se añadió 2-mercaptoetanol hasta una concentración final de 1 mM. Se calentó moderadamente la mezcla de muestra a 48 - 50 °C durante 5 minutos. Se eligió esta temperatura para minimizar la disociación del enlace covalente entre la enzima y el anticuerpo, mientras que todavía se permite disociar las cadenas ligera y pesada de la porción de anticuerpo del conjugado por el 2-mercaptoetanol. A continuación se enfrió cada muestra y se añadió a diferentes pocillos de un gel de poliacrilamida (un gel Bis-Tris de poliacrilamida al 4-20 % NuPAGE™ preformado de 1,0 mm de grosor o bien un gel Tris-acetato de poliacrilamida al 3-8 % NuPAGE™ de invitrogen, Carlsbad, CA). Los estándares de peso molecular usados fueron los estándares Multimark™ y Mark12 wide range™ preteñidos, que se adquirieron de invitrogen (Carlsbad, CA). La electroforesis se llevó a cabo a 70 mA durante de 60 a 90 minutos a temperatura ambiente usando un sistema de casete Novex XCell II (Invitrogen, Carlsbad, CA). El tampón de migración fue tampón MES-SDS o Tris-acetato-SDS, para geles al 3-8 % y 4-20 %, respectivamente. Se retiraron los geles de los casetes y se lavaron dos veces en agua desionizada durante 5 minutos para retirar el SDS y el tampón. A continuación se fijaron los geles SDS-PAGE en etanol/agua/ácido acético [40:50:10 (v:v:v)] durante 1 hora a temperatura ambiente y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 disuelto en metanol/agua/ácido acético [50:40:10 (v:v:v), Sigma-Aldrich, San Luis, MO]. Se tiñeron los geles durante un mínimo de 2 horas hasta un máximo de una noche por balanceo suave a temperatura ambiente. Se realizó la eliminación de tinción de la misma manera que la tinción. La solución de eliminación de tinción fue idéntica a la solución de tinción menos el tinte. Se secaron los geles usando un kit de secado de gel invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA). El análisis de los geles mostró claramente para cada uno de los conjugados la presencia de una banda a un peso molecular correspondiente a la cadena ligera del anticuerpo. Además, para cada conjugado, existió una ausencia sustancial de bandas correspondientes al peso molecular de la cadena pesada y de la fosfatasa alcalina. En cambio, una serie de bandas a pesos moleculares mayores mostró que la fosfatasa alcalina se unió selectivamente a la cadena pesada de las IgG para cada conjugado. Puesto que la cadena pesada de una inmunoglobulina incluye la región Fc, los resultados mostraron la naturaleza específica del sitio Fc de la conjugación.

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

En este ejemplo, se describe la preparación de un conjugado de anticuerpo específico de Fc que incluye un conector hidracida-tiol a base de FEG. Se añadieron grupos maleimida reactivos con tiol a la peroxidasa de rábano picante como sigue. A un vial ámbar de 4 ml se le añadieron 7,8 mg (15,2  $\mu$ mol, 100 eq.) de MAL-dPEG<sub>4</sub>™ éster NHS (Quanta Bidesign, Powell, OH), seguido de peroxidasa de rábano picante (HRP; Pierce Biotechnology, Rockford, IL; 0,25 ml, 25 mg/ml en Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5). Se hizo girar el vial en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora antes de purificarse por cromatografía de exclusión por tamaño usando un Akta Purifier equipado con una columna Superdex 200 (GE Biosciences, Uppsala, Suecia) usando una solución tampón acuosa (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5). Se agruparon las fracciones que contenían HRP para dar una solución de HRP-PEG4-maleimida. Se determinó la concentración de HRP a partir de la A<sub>280</sub> de la solución ( $\epsilon_{280}$  = 0,652 ml cm<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) y se

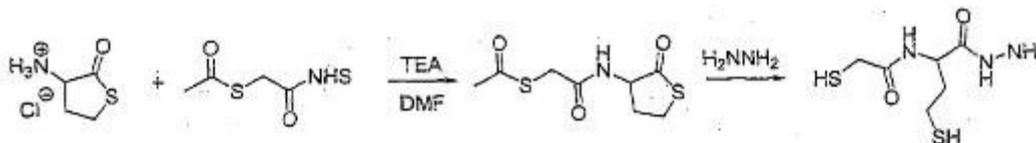
cuantificó que el número de maleimidias a través de un ensayo de Ellman modificado estaba entre 6 y 8 maleimidias por enzima.

Se combinó la maleimido-peroxidasa de rábano picante purificada con un anticuerpo tiolado purificado (de acuerdo con el ejemplo 4, preparado usando un conector MBH) en una proporción molar 3:1 y se hizo girar durante un período de 18 h. La cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5) dio el conjugado purificado que se diluyó a una A<sub>280</sub> = 0,0375 en diluyente avidina con bloqueante B5 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y se analizó en tejido. Una comparación de la tinción de antígeno específico prostático en tejido prostático usando el conjugado de HRP de este ejemplo con un conjugado de HRP preparado por reducción con DTT de la inmunoglobulina como se describe en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 60/675.759 mostró que el conjugado de HRP de este ejemplo presentó ligeramente menos fondo que el conjugado de HRP preparado con DTT, pero también presentó ligeramente menos intensidad de tinción.

**Ejemplo 20 - Conectores hidracida-tiol multifuncionales derivados de aminoácidos**

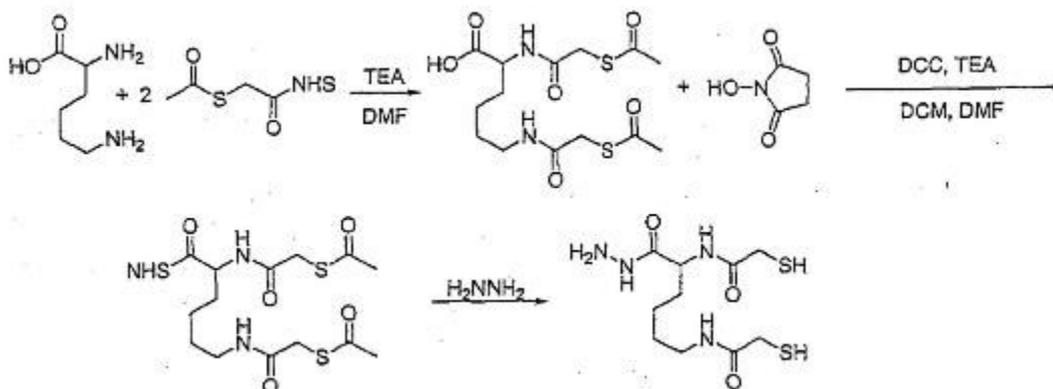
En algunos modos de realización, se preparan conectores hidracida-tiol multifuncionales que se pueden usar en el procedimiento divulgado a partir de aminoácidos y análogos de aminoácidos de acuerdo con los esquemas 4a, 4b, 4c y 4d anteriores. En este ejemplo, las vías sintéticas para conectores específicos se explican en los siguientes esquemas. En cada uno de los esquemas específicos 17a, 17b, 17c y 17d, se hace reaccionar en primer lugar un aminoácido o análogo de aminoácido (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) con S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA; Pierce Biotechnology, Rockford, IL) en presencia de trietilamina (TEA). En el esquema 17a, se hace reaccionar el producto de esta primera reacción con hidracina para proporcionar un conector hidracida-tiol multifuncional que tiene un grupo hidracida y dos grupos tiol. En el esquema 17b, se usa el acoplamiento meditado con carbodiimida con DCC para formar un éster activo de NHS con la funcionalidad de ácido carboxílico del producto de la primera reacción, seguido de reacción con hidracina para proporcionar otro conector hidracida-tiol multifuncional que tiene un grupo hidracida y dos grupos tiol. En el esquema 17c, como en el 17b, la formación de éster NHS usando el producto de la primera reacción se sigue de reacción con hidracina para proporcionar un conector hidracida-tiol multifuncional que tiene dos grupos hidracida y un grupo tiol. En el esquema 17d, la reacción con hidracina proporciona un conector hidracida-tiol multifuncional que tiene un grupo hidracida, un grupo tiol y un grupo hidroxilo.

**Derivado de homocisteína**



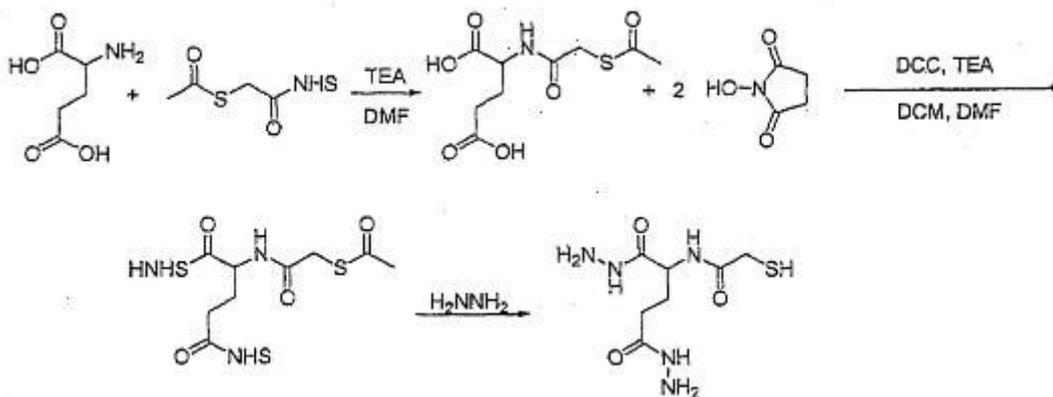
Esquema 17a

**Derivado de lisina**



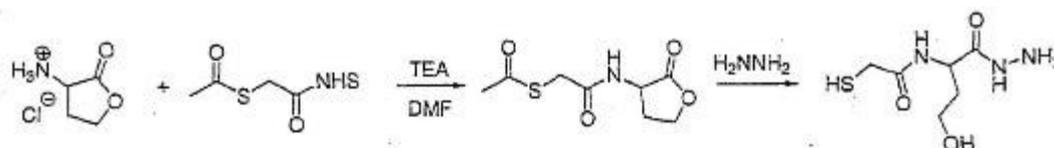
Esquema 17b

**Derivado de ácido glutámico**



Esquema 17c

## 5 Derivado de homocisteina

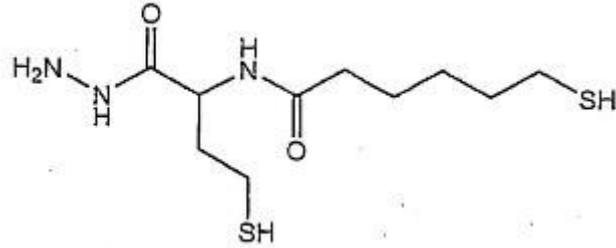


Esquema 17d

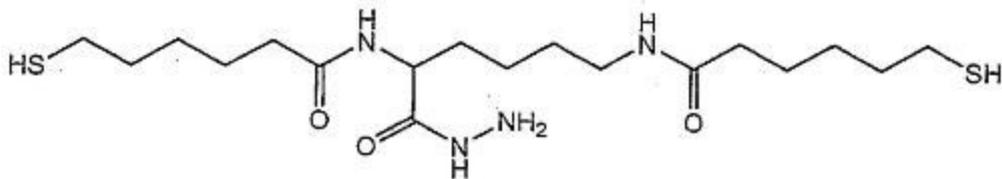
10 Los productos de los esquemas 17a, 17b, 17c y 17d son, respectivamente, 2-mercaptoacetamido-ácido mercaptobutírico-hidracida (MAMBH), N,N'-(6-hidracinil-6-oxohexano-1,5-diil)bis(2-mercaptoacetamida) (BTAL), N-(1,5-dihidracinil-1,5-dioxopentano-2-il)-2-mercaptoacetamida (TAGD) y N-(1-hidracinil-4-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-2-mercaptoacetamida.

15 En un modo de realización particular, se sintetiza MAMBH como sigue. En primer lugar, se prepara S-acetiltioacetamida-homocisteína preparando una solución de trietilamina (0,15 ml, 1,1 mmol) en acetonitrilo (10 ml) a la que se añadió clorhidrato de homocisteína (150 mg, 1,0 mmol). Se agitó la suspensión resultante durante 5 minutos antes de la adición de S-acetiltioacetato (250 mg, 1,1 mmol). Se agitó la reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente y a continuación se concentró a vacío. La cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, 9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Et<sub>2</sub>O) dio como resultado el aislamiento del producto como un polvo incoloro. Rendimiento: 174 mg (75 %): RMN de <sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,66 (bs, 1 H), 4,51-4,41 (p, J= 6,7 Hz, 1 H), 3,63-3,50 (m, 2 H), 3,36-3,18 (m, 2 H), 2,88-2,80 (m, 1 H), 2,38 (s, 3 H), 2,01-1,88 (m, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 204,37, 195,38, 168,59,59,51, 32,74, 31,43, 30,18, 27,43; ESI-HRMS *m/z* 256,00693 (M + Na<sup>+</sup>, C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>3</sub>S<sub>2</sub> calc. 256,00780). A continuación se prepara 2-mercaptoacetamido-ácido mercaptobutírico-hidracida (MAMBH) añadiendo la S-acetiltioacetamida-homocisteína (300 mg, 1,3 mmol) al monohidrato de hidracina (10 ml). Se agitó la suspensión resultante durante 16 h a temperatura ambiente, momento en el que la solución se vuelve homogénea. Se retiró la hidracina a vacío y se purificó el producto bruto por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C<sub>8</sub> SiO<sub>2</sub> al 15 %, 160:39:1 H<sub>2</sub>O / MeOH./ AcOH) para dar el compuesto deseado como un aceite incoloro. Rendimiento: 207 mg (72 %): RMN de <sup>1</sup>H (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,52-4,46 (m, 1 H), 3,23-3,21 (m, 2 H), 2,59-2,52 (m, 2 H), 2,10-2,01 (m, 2 H); RMN de <sup>13</sup>C (62,9 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 172,82, 172,43, 52,49, 37,72, 21,42, 20,49; ESI-HRMS *m/z* 246,03251 (M + Na<sup>+</sup>, C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>S<sub>2</sub> calc. 246,03469).

35 La sustitución del éster NHS del ácido 6-acetiltiohexanoico por SATA en los esquemas 17a, 17b y 17c proporciona los correspondientes compuestos TMBH, BTHL y THGD que se muestran a continuación. El éster NHS del ácido 6-acetiltiohexanoico tiene la siguiente estructura. El éster NHS del ácido 6-acetiltiohexanoico se puede preparar a partir de un acoplamiento mediado por carbodiimida del ácido 6-acetiltiohexanoico con N-hidroxisuccinimida.

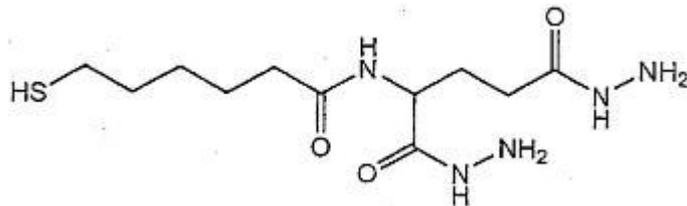


ácido tiohexanamidomercaptobutírico-hidrácida (THMBH)



5

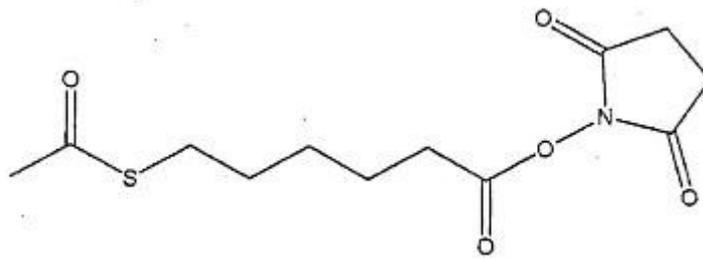
Bistiohexanamidohidrácidolisina (BTHL)



10

Ácido tiohexamidoglutámico-dihidrácida (THGD)

El éster NHS del ácido 6-acetiltiohexanoico tiene la siguiente estructura:

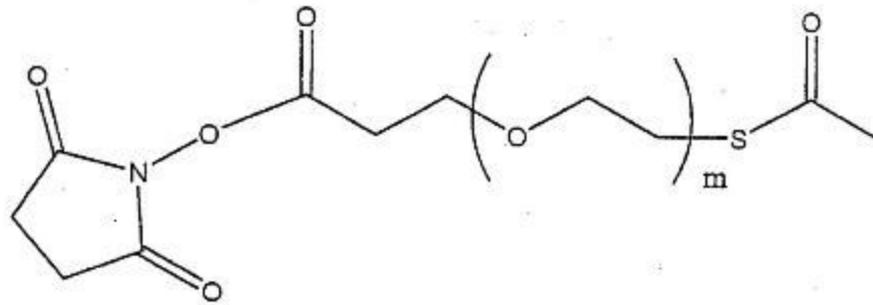


15

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

20 Un experto en la técnica también reconocerá que los derivados del ácido S-acetil-tiocarboxílico a base de PEG se pueden sustituir por SATA en los esquemas anteriores para proporcionar conectores a base de PEG multifuncionales que se usan en el procedimiento de conjugación divulgado. Por ejemplo, se pueden preparar conectores hidrácida-tiol multifuncionales a base de PEG sustituyendo una molécula de la siguiente fórmula por SATA en los esquemas 17 y

25



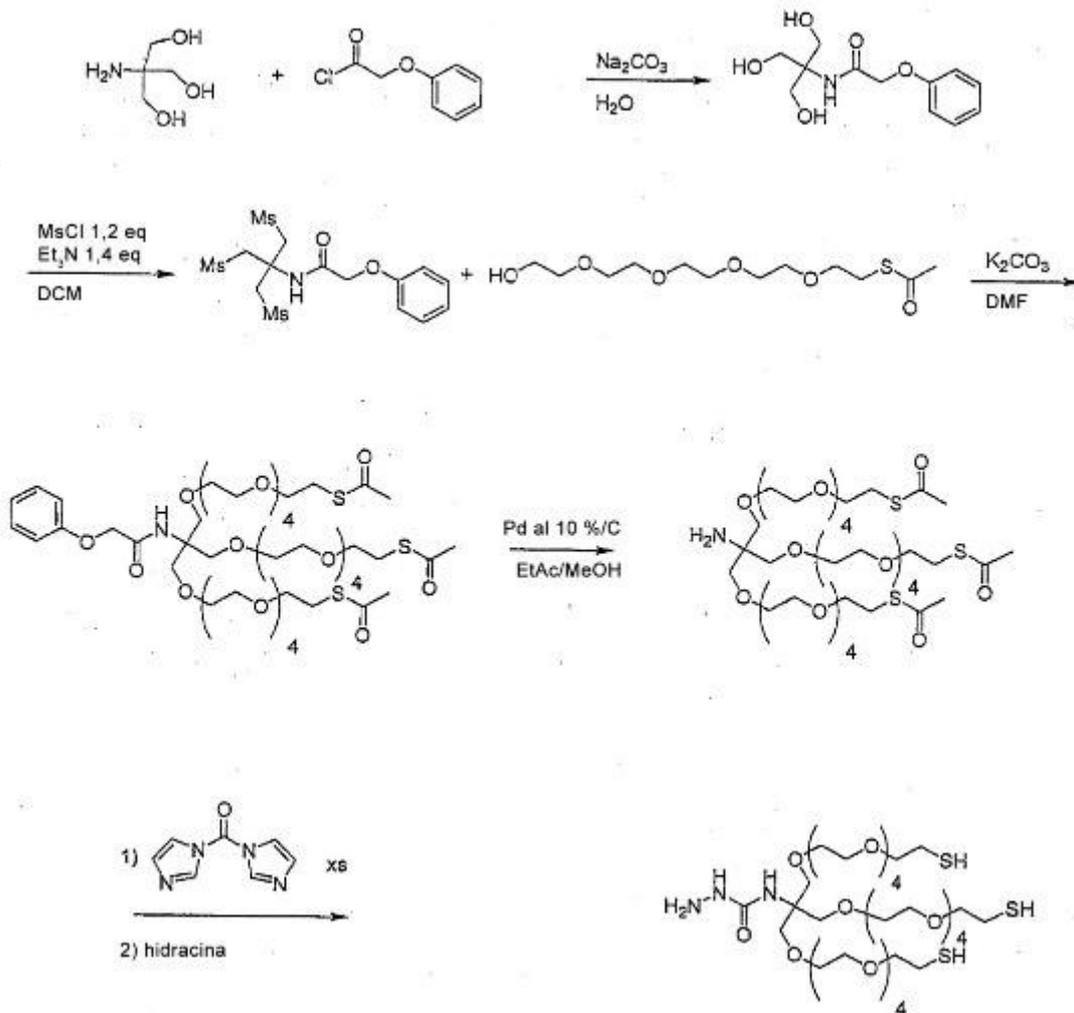
en la que  $m = 2$  a 50. Los compuestos de esta fórmula están disponibles comercialmente en Quanta Biodesign (Powell, OH), o se pueden preparar a partir de los correspondientes ácidos carboxílicos.

5

**Ejemplo 21 - Conectores hidracida-tiol a base de PEG multifuncionales**

En algunos modos de realización, se preparan conectores hidracida-tiol a base de PEG multifuncionales que se pueden usar en el procedimiento divulgado de acuerdo con los esquemas 5a, 5b y 5c anteriores. En este ejemplo, las vías sintéticas para conectores específicos se explican en los siguientes esquemas 18a, 18b y 18c. También se presentan protocolos específicos para las reacciones. A menos que se establezca de otro modo, los reactivos y disolventes son convencionales y se pueden obtener, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (San Luis, MO).

10



15

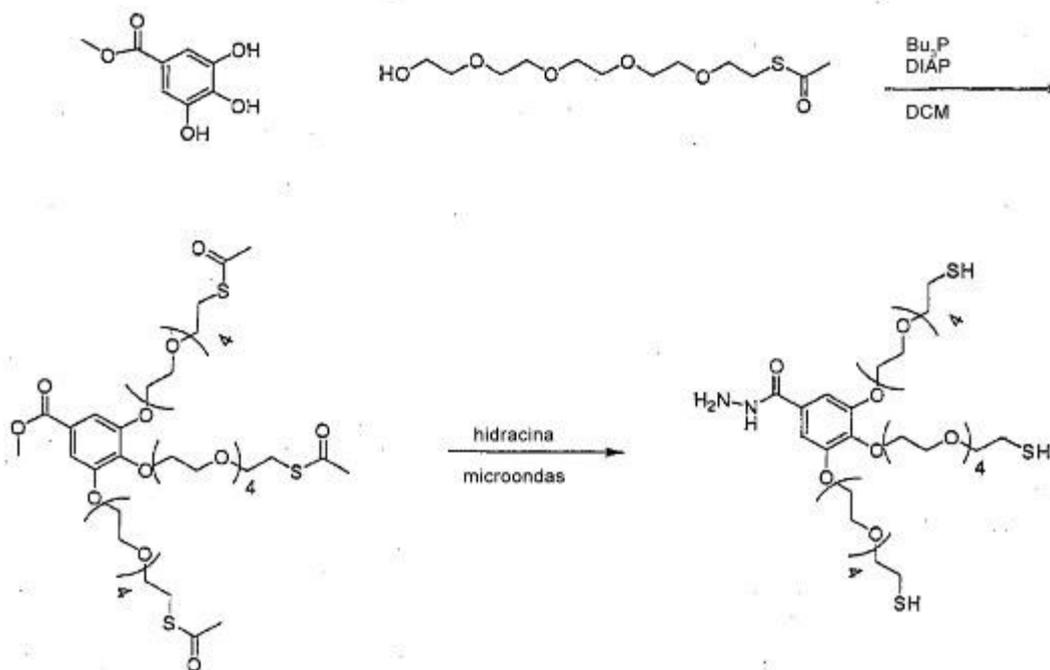
**Esquema 18a**

De acuerdo con el esquema 18a, a una solución de 5,0 gramos de Tris en 10 ml de agua se le añade carbonato de

5 sodio (1,3 eq) seguido de cloruro de fenoxiacetilceto (1,2 eq), y se deja que la reacción se agite en hielo bajo nitrógeno durante 16 horas. A continuación se lava el producto protegido con amino precipitado tres veces con agua y se seca a vacío. Se obtiene el compuesto puro resultante de esta primera reacción por cromatografía en una columna a base de sílice C18 eluida con acetonitrilo/H<sub>2</sub>O, acetonitrilo al 5-100 % durante 30 minutos. A continuación se introducen

10 grupos mesilato tratando con trietilamina (4,0 eq) y cloruro de metanosulfonilo (5,0 eq) en DMF. Se retira el DMF a vacío, se lleva el residuo a DCM seco y se retiran las sales por filtración. La retirada del DCM a vacío da el mesilato crudo 2 que se usa sin purificación adicional. A una solución del mesilato (0,3 eq) en DMF seco se le añade HO-dPEG<sub>4</sub><sup>TM</sup>-SATA (1,0 eq; Quanta Biodesign, Powell, OH) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 eq) y se deja que la reacción se agite bajo nitrógeno durante 16 horas. Se retira el DMF a vacío, se lleva el residuo a DCM seco y se retiran las sales por filtración.

La retirada del DCM a vacío seguido de cromatografía en gel de sílice da el intermedio pegilado. A continuación se retira el grupo protector Pac tratando con Pd/C en una mezcla de EtAc/MeOH. A continuación se elabora la semicarbídica tratando el intermedio resultante en primer lugar con carbonildiimidazol (10 eq) seguido de hidracina (100 eq).



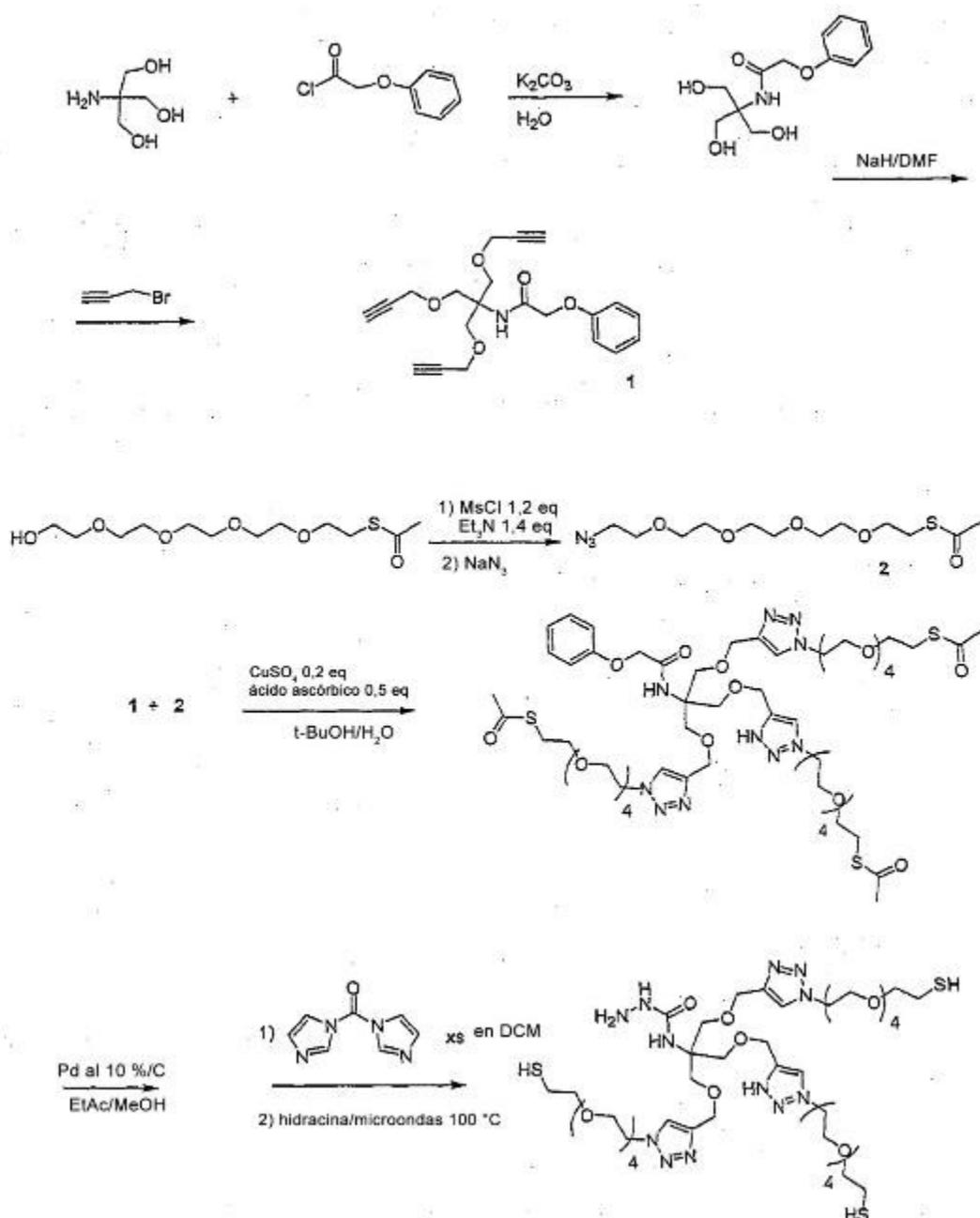
15

Esquema 18b

20 De acuerdo con el esquema 18b, a una solución de alcohol (HO-PEG<sub>4</sub>-SATA, Quanta Biodesign, Powell, OH, 1,3 eq) en DCM se le añaden 1,5 eq de dicarboxilato de diazodiisopropilo seguido de 1,8 eq de tributilfosfina, y se agita la reacción bajo nitrógeno seco durante 30 minutos. A la suspensión resultante se le añade a continuación 1,0 eq del fenol en DCM y se deja que la reacción se agite bajo nitrógeno seco durante 16 h. A continuación se lleva el éter

25 fenólico obtenido después de la cromatografía en gel de sílice a hidracina pura y se somete a microondas la solución para dar el conector hidracida-tiol a base de PEG multifuncional.

25



Esquema 18c

- 5 De acuerdo con el esquema 18c, a una solución de 5,0 gramos de Tris en 10 ml de agua se le añade carbonato de potasio (1,3 eq) seguido de cloruro de fenoxiacetilcelilo (1,2 eq), y se deja que la reacción se agite en hielo bajo nitrógeno durante 16 horas. A continuación se lava el producto protegido con amino precipitado tres veces con agua y se seca a vacío. A continuación se introducen los grupos alquino tratando con hidruro de sodio (3,0 eq) y bromuro de propargilo (10 eq) en DMF para dar el intermedio alquino 1 después de la cromatografía en gel de sílice. A una solución de HO-PEG4-SATA (Quanta Biodesign, Powell, OH) en DCM se le añade cloruro de metanosulfonilo (1,2 eq) seguido de trietilamina (1,4 eq), y se deja que la reacción se agite en hielo bajo nitrógeno durante 16 horas. A continuación se retira la sal de trietilamina por filtración y se seca el producto de mesilato a vacío. A una solución del alcohol mesilado en DCM se le añade ácido de sodio (1,2 eq), y se deja que la reacción se agite bajo nitrógeno durante 16 horas para dar el intermedio ácido 2 después de la cromatografía en gel de sílice. A una solución 1:1 de *t*-butanol/agua que contiene sulfato de cobre (0,2 eq) y ascorbato de sodio (0,5 eq) se le añade un equivalente a cada uno del alquino intermedio 1 y la ácido intermedia 2. A continuación se agita la reacción bajo nitrógeno durante dieciséis horas para dar el intermedio con el nitrógeno protegido después de la cromatografía en gel de sílice. A continuación se retira el grupo protector de nitrógeno tratando con Pd al 10 %/C en una mezcla 1:1 de acetato de etilo y metanol y a continuación se obtiene la amina libre por un tratamiento ácido-base. A una solución de la amina libre en DCM se le
- 10
- 15

añade carbonildiimidazol (10 eq), y se deja que la reacción se agite bajo nitrógeno durante cuatro horas. A continuación se concentra la reacción a vacío y se lleva el residuo a hidracina pura. A continuación se somete a microondas la solución a 100 °C durante 1 hora para dar el conector hidracida-tiol a base de PEG multifuncional.

- 5 Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que las moléculas a base de PEG se pueden reemplazar por otros alcoholes SATA en estos esquemas para proporcionar conectores hidracida-tiol a base de PEG multifuncionales adicionales, y que los alcoholes PEG SATA de diferentes longitudes se pueden sustituir también.

#### Ejemplo 22 - Síntesis de un conector poliacrilamida-hidracida-tiol

- 10 En este ejemplo, se proporciona un conector hidracida-tiol multivalente polimérico, conector que se puede preparar de acuerdo con el esquema 19 a continuación.



15

Esquema 19

- 20 En el esquema 19, x puede ser, por ejemplo, 100-500 e y puede ser, por ejemplo, 10-50. L representa un reactivo tiolante usado para convertir una porción de los grupos hidracida en grupos tiol. Se puede sintetizar poliacrilamida-hidracida (PAH) por el procedimiento proporcionado en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 20050158770. En resumen, en un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con un condensador, se mezclan 20 ml de poliacrilamida (1 mmol, 50 % en peso en agua, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wis.) con 10 ml de agua destilada (DI) y 20 ml de monohidrato de hidracina (420 mmol, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wis.). Se somete a microondas la reacción durante 60 min. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se precipita la reacción con un volumen igual de metanol, se centrifuga y se decanta. Se toma el residuo en 50 ml de agua DI y se repitió la precipitación un total de tres veces. Se disuelve el residuo final en agua DI para dar un polvo higroscópico blanco fino. En un disolvente apropiado, se hace reaccionar el PAH resultante con un agente tiolante, tal como tiol-dPEG-éster NHS (Quanta Biodesign, 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 hidracida-tiol multifuncional polimérico que se puede usar en el procedimiento divulgado. Se pueden encontrar reactivos tiolantes adicionales, por ejemplo, en Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8.

- 30 Es posible usar/preparar el conector poliacrilamida-hidracida-tiol en una de dos formas, sintetizarlo en primer lugar y usar el procedimiento de conjugación divulgado, o bien hacer reaccionar en primer lugar PAH con una molécula, tiolar PAH, y a continuación hacer reaccionar la primera molécula ya tiolada con una segunda molécula.

- 35 Aunque la descripción detallada se ha centrado en conjugados anticuerpo-enzima, los conectores y procedimientos se pueden usar para preparar cualquier tipo de conjugado incluyendo conjugados de anticuerpos y otros marcadores detectables tales como nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas metálicas y semiconductoras tales como nanopartículas de oro y puntos cuánticos, respectivamente), moléculas fluorescentes, moléculas fluorogénicas, moléculas coloreadas, moléculas colorogénicas y construcciones paramagnéticas (tales como quelatos de iones paramagnéticos). También se contemplan conjugados de anticuerpos para tratamientos dirigidos (por ejemplo, conjugados de anticuerpos con moléculas de fármacos, toxinas y construcciones radiactivas tales como quelatos de iones metálicos radiactivos). Aunque, los ejemplos específicos proporcionados muestran el uso de conectores hidracida-tiol que tienen grupos hidracida y carbohidracida, cualquier "grupo hidracida" se puede sustituir por los grupos hidracida o carbohidracida mostrados tanto en el procedimiento divulgado como en el conjugado divulgado. Además, se debe entender que aunque se puede usar uno o más de un único conector hidracida-tiol para formar un conjugado, también es posible usar múltiples conectores hidracida-tiol diferentes para formar un conjugado. Los conjugados divulgados se pueden usar en cualquier tipo de ensayo donde se puede usar una molécula de unión específica unida a un marcador detectable, por ejemplo, en cualquier tipo de inmunoanálisis además de los ensayos inmunohistoquímicos ilustrados, o en cualquier tipo de ensayo de hibridación *in situ*. Los protocolos de detección se pueden realizar manualmente o de forma automatizada. Además, los conectores divulgados también se pueden usar para unir moléculas a un sustrato, y dichas reacciones de modificación de superficie se pueden realizar usando el procedimiento divulgado.

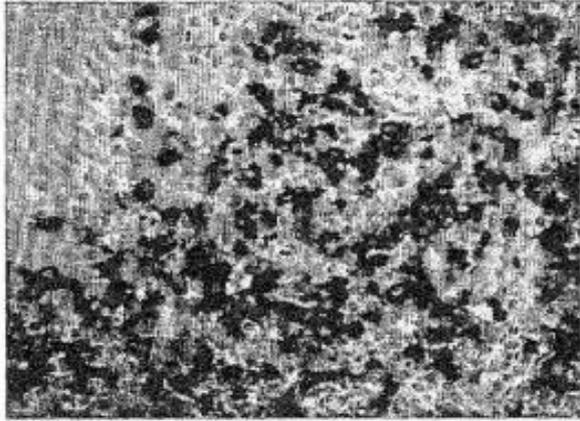
40

45

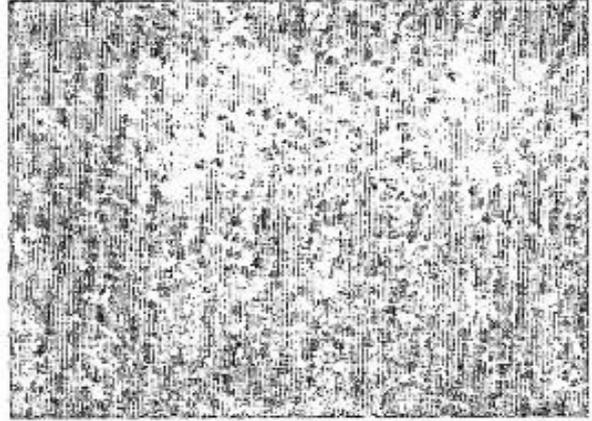
50

**REIVINDICACIONES**

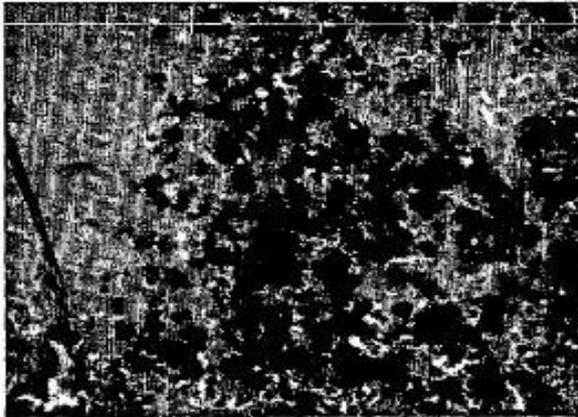
- 5 1. Un conjugado que comprende un anticuerpo unido covalentemente a un marcador detectable a través de un conector hidracida-tiol,
- 10 en el que el conector hidracida-tiol es uno o más de MBH, MBCH, MAMBH, THMBH, BTAL, BTHL, TAGD, THGD, un conector hidracida-tiol a base de PEG, un conector de hidracida-tiol multifuncional, un conector hidracida-tiol multifuncional a base de PEG, y un conector poliacrilamida-hidracida-tiol, en el que un grupo hidracida del conector se une covalentemente a una región Fc del anticuerpo; y en el que el marcador detectable es una enzima que tiene al menos un grupo reactivo con tiol, en el que un grupo tiol del conector hidracida-tiol se acopla al al menos un grupo reactivo con tiol de la enzima.
- 15 2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante.
3. El conjugado de la reivindicación 2, en el que la fosfatasa alcalina comprende fosfatasa alcalina reticulada.
- 20 4. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-hapteno o un anticuerpo anti-anticuerpo.
5. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el al menos un grupo reactivo con tiol es disulfuro de piridilo.
- 25 6. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une covalentemente a más de un conector hidracida-tiol.
7. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el marcador detectable es una enzima fosfatasa, el conector hidracida-tiol es un conector ácido mercaptobutírico-hidracida, y el al menos un grupo reactivo con tiol es al menos un grupo maleimida, en el que un grupo tiol del conector ácido mercaptobutírico-hidracida se une covalentemente al al menos a un grupo maleimida de la enzima fosfatasa.
- 30 8. El conjugado de la reivindicación 7, en el que la enzima fosfatasa es una fosfatasa alcalina.
9. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7, en el que el/los grupo(s) reactivo(s) con tiol es/son una maleimida/maleimidas.
- 35 10. Un conjugado de un anticuerpo y una enzima fosfatasa modificada, comprendiendo la enzima fosfatasa modificada al menos un grupo reactivo con tiol, en el que el anticuerpo y la enzima fosfatasa modificada se acoplan a través de un conector ácido mercaptobutírico-hidracida, y en el que un grupo hidracida del conector ácido mercaptobutírico-hidracida se une covalentemente a una región Fc del anticuerpo.
- 40 11. El conjugado de la reivindicación 10, en el que el al menos un grupo reactivo con tiol es una maleimida.
12. El conjugado de la reivindicación 10, en el que el al menos un grupo reactivo con tiol es disulfuro de piridilo.
- 45 13. El conjugado de la reivindicación 10, en el que un grupo tiol del conector ácido mercaptobutírico-hidracida se une covalentemente al al menos un grupo reactivo con tiol de la enzima fosfatasa modificada.



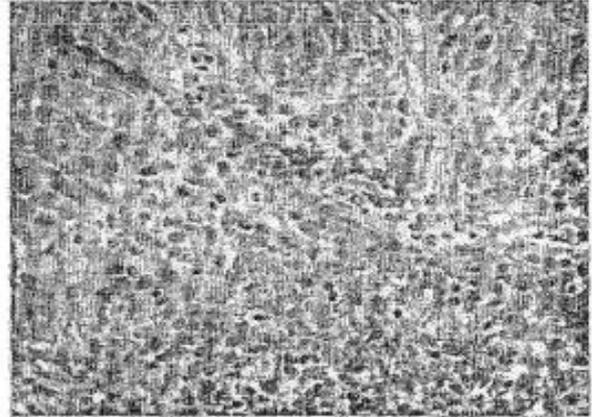
**FIG. 1A**



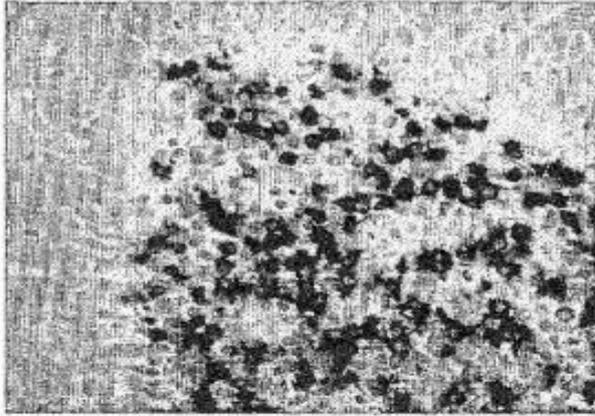
**FIG. 1B**



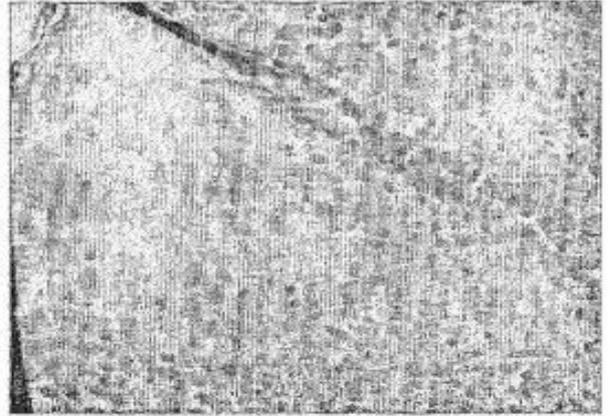
**FIG. 1C**



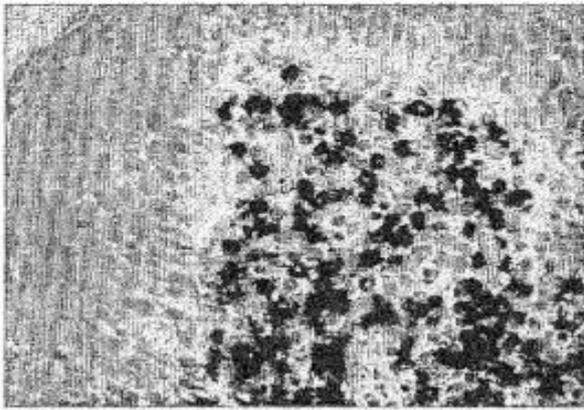
**FIG. 1D**



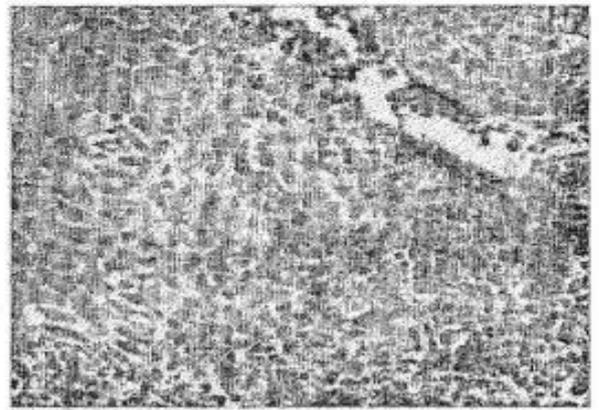
**FIG. 2A**



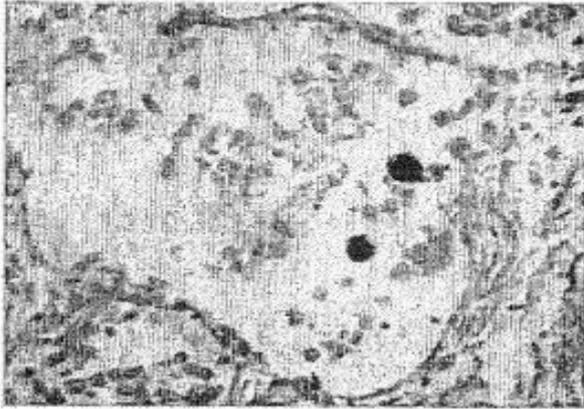
**FIG. 2B**



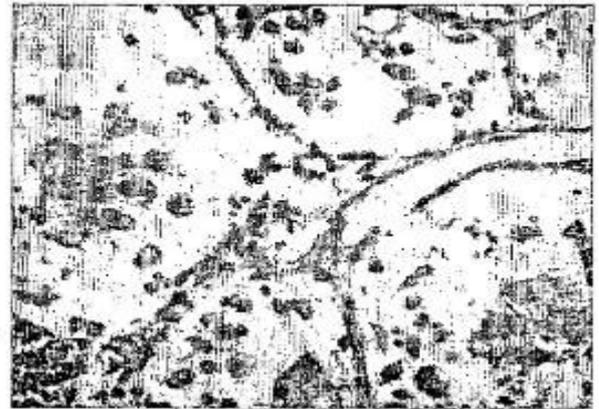
**FIG. 2C**



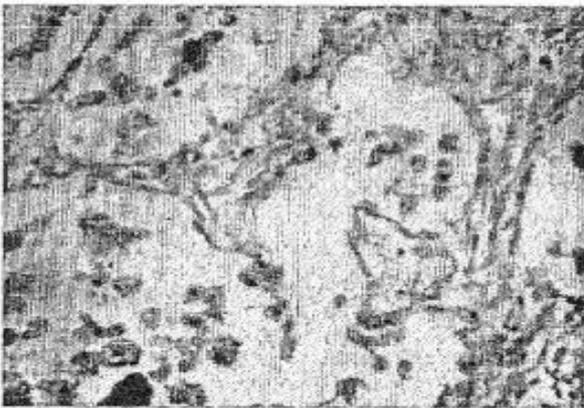
**FIG. 2D**



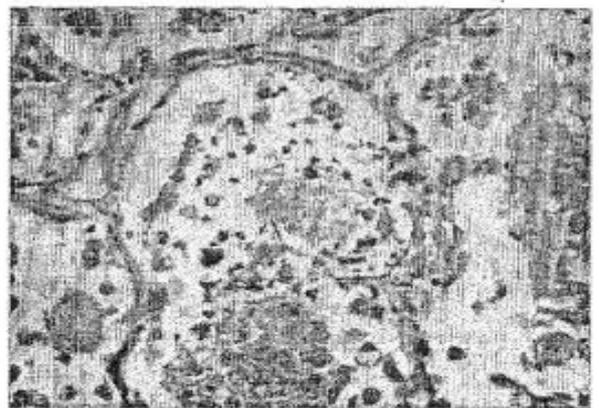
**FIG. 3A**



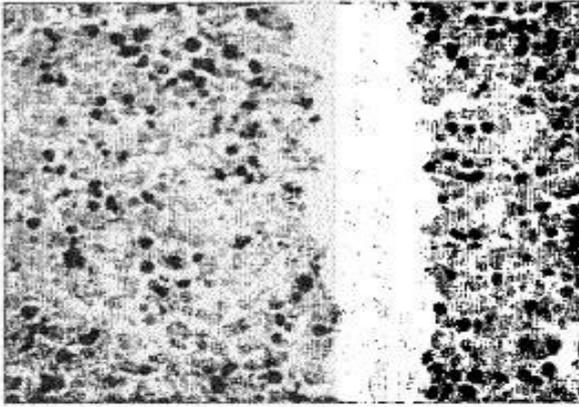
**FIG. 3B**



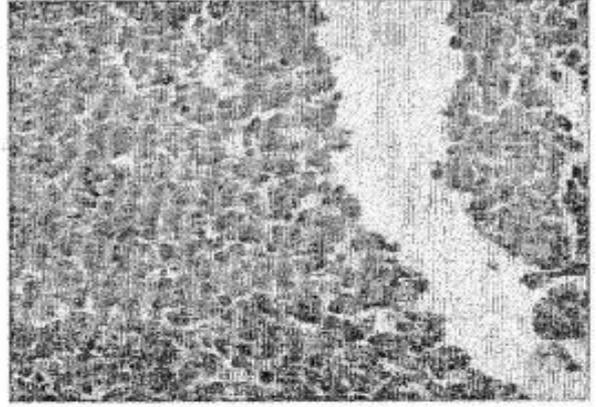
**FIG. 3C**



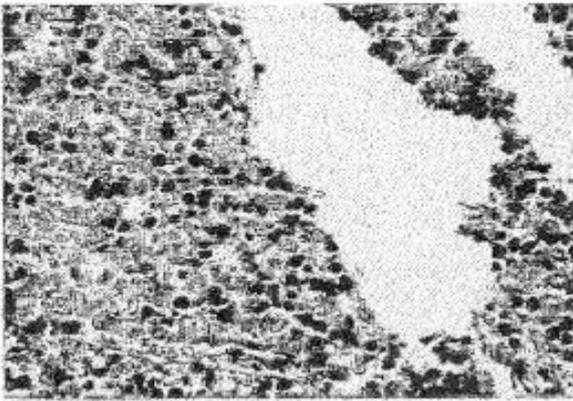
**FIG. 3D**



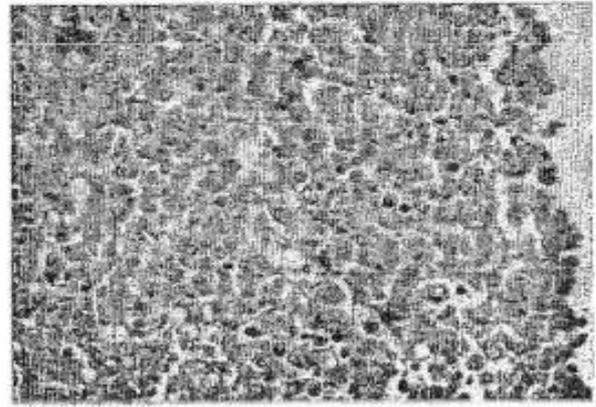
**FIG. 4A**



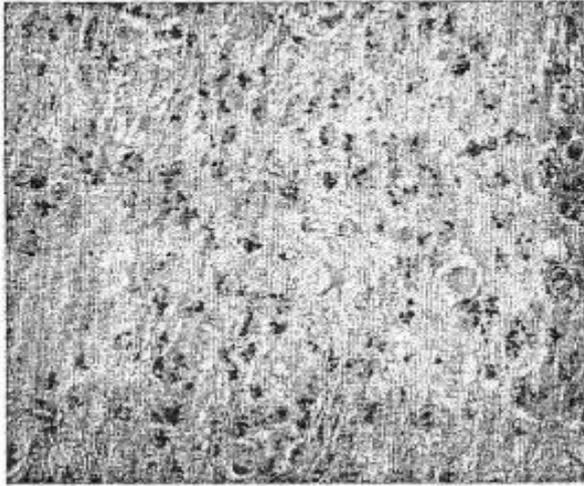
**FIG. 4B**



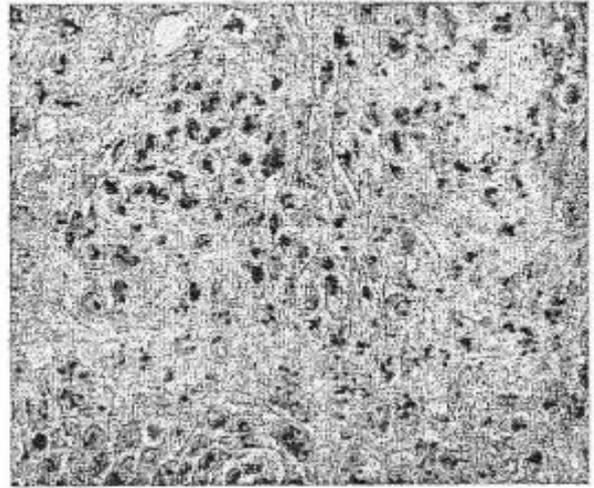
**FIG. 4C**



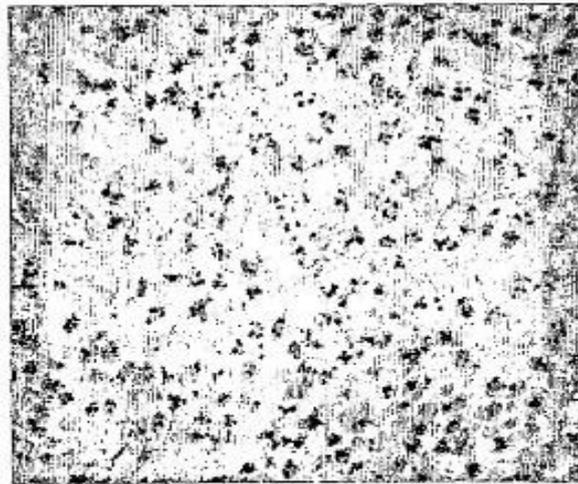
**FIG. 4D**



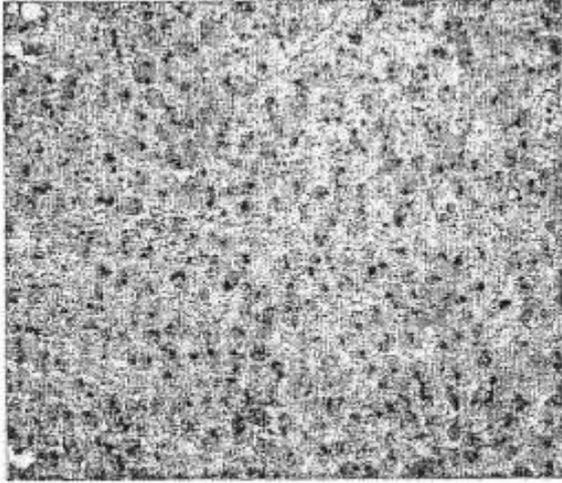
**FIG. 5A**



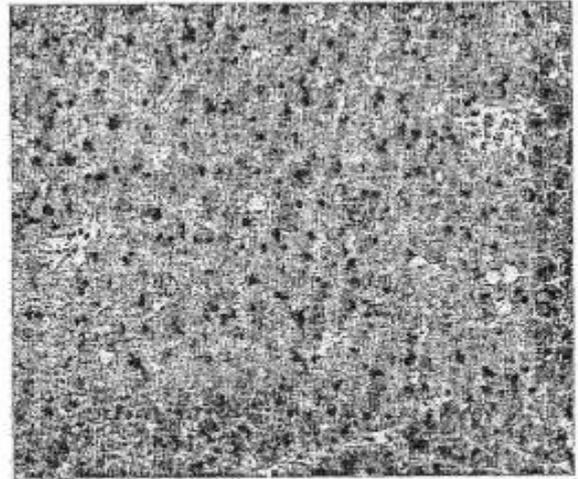
**FIG. 5B**



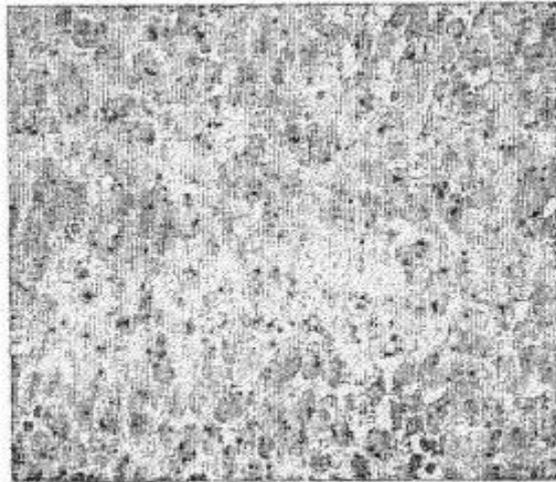
**FIG. 5C**



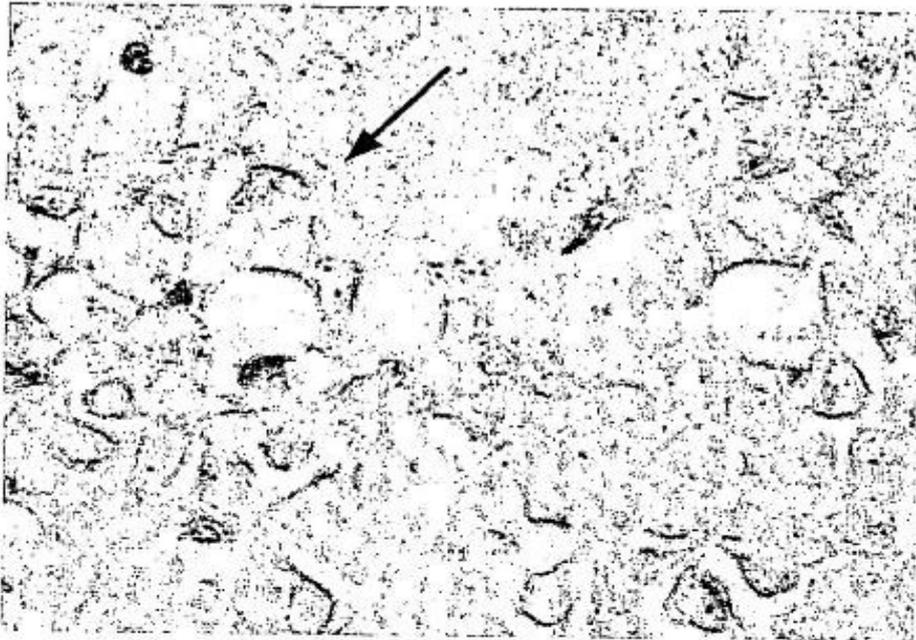
**FIG. 6A**



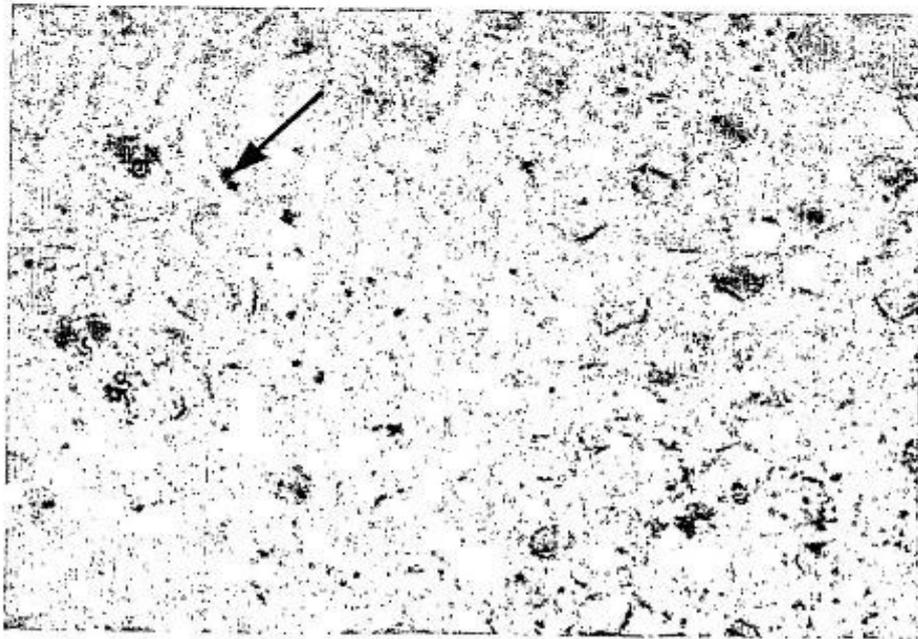
**FIG. 6B**



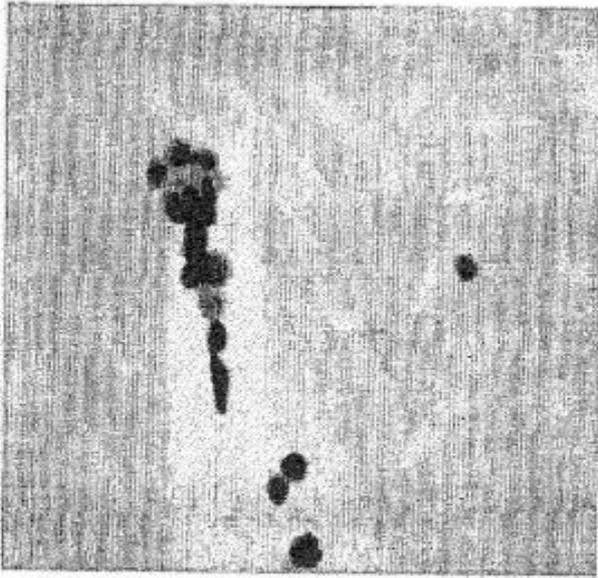
**FIG. 6C**



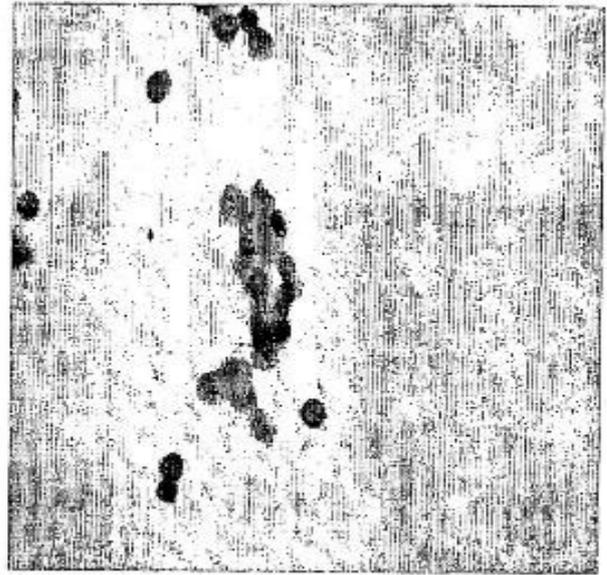
**FIG. 7A**



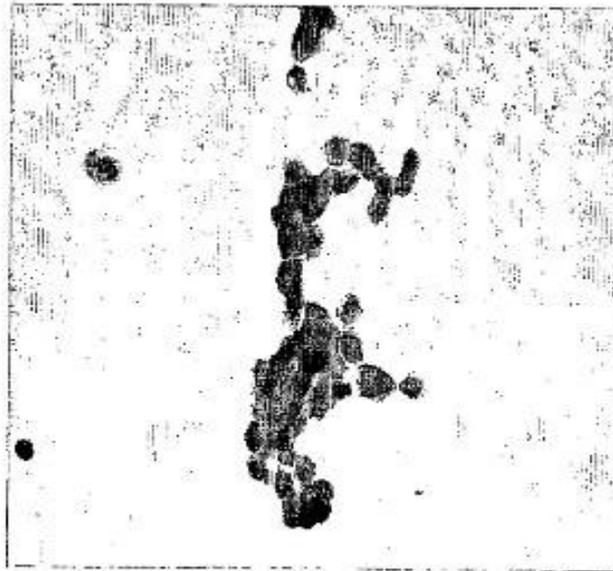
**FIG. 7B**



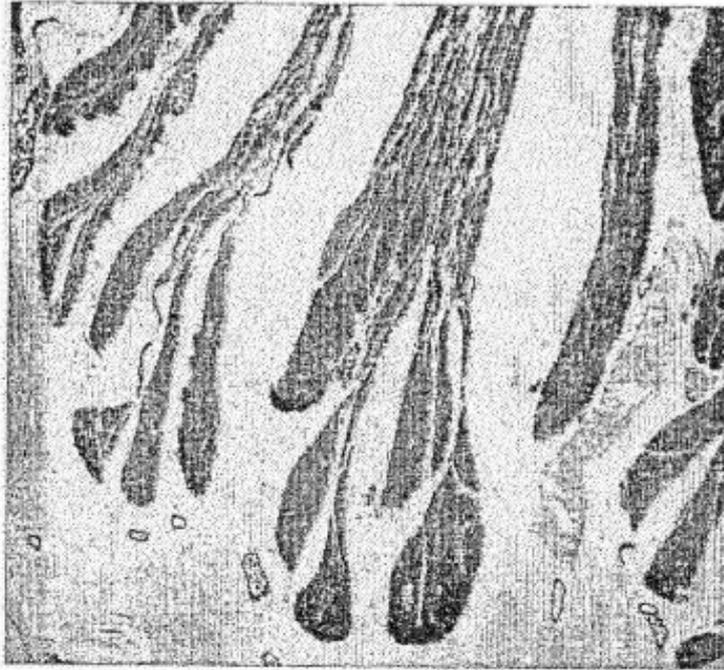
**FIG. 8A**



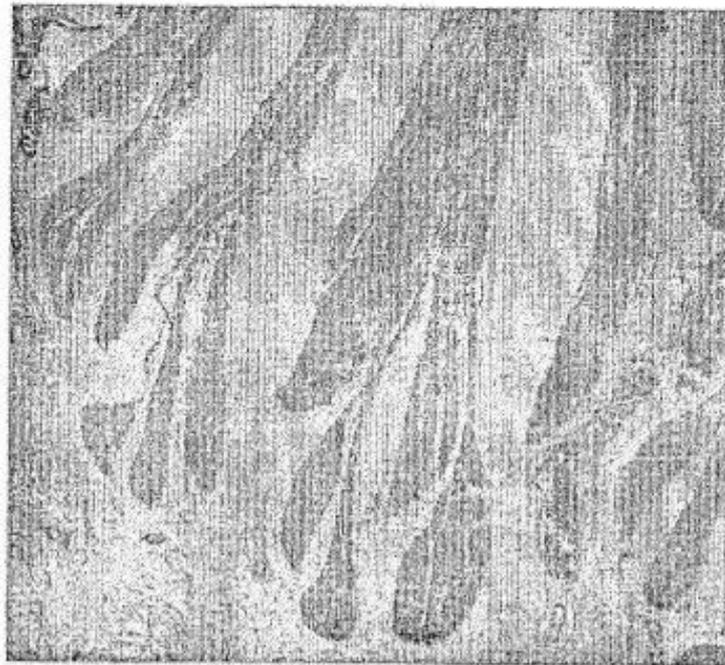
**FIG. 8B**



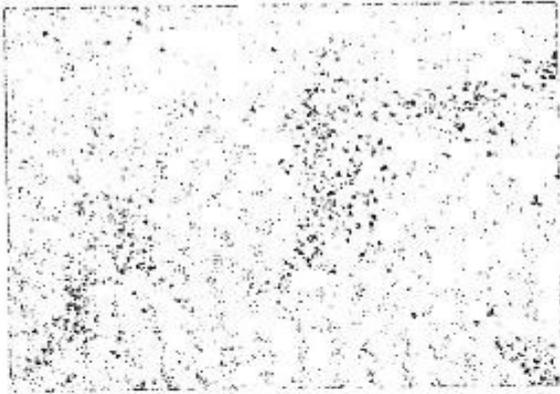
**FIG. 8C**



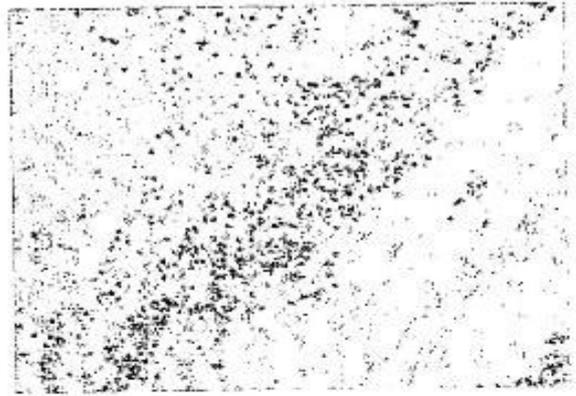
**FIG. 9A**



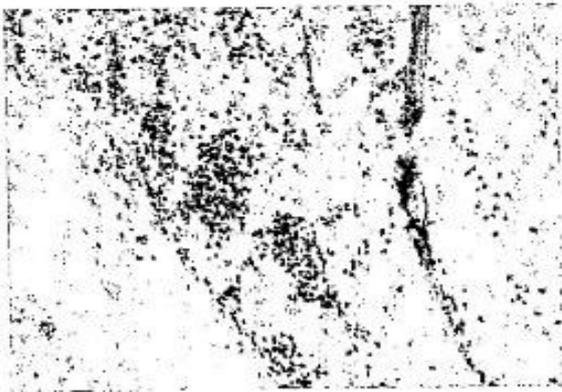
**FIG. 9B**



**FIG. 10A**



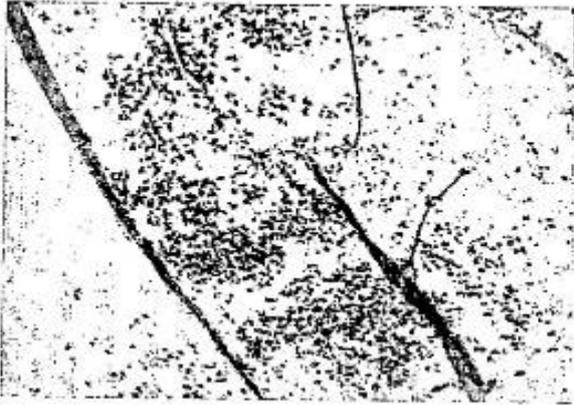
**FIG. 10B**



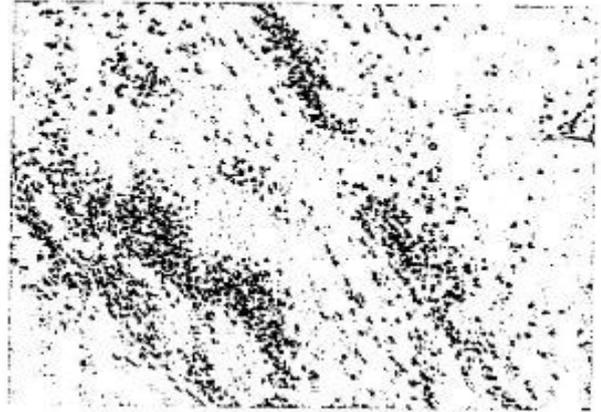
**FIG. 10C**



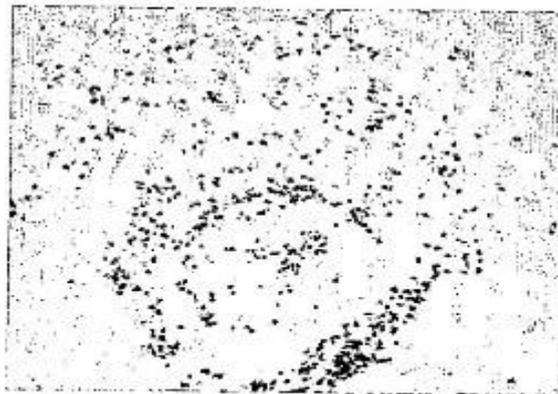
**FIG. 10D**



**FIG. 10E**



**FIG. 10F**



**FIG. 10G**