(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 356 559**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
C07C 237/48 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06291910 .5**
(96) Fecha de presentación : **12.12.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1798241**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

(54) Título: **Procedimiento de fabricación de un complejo entre doxiciclina y albúmina sérica bovina y su aplicación a la fabricación de un anticuerpo antidoxiciclina.**

(30) Prioridad: **13.12.2005 FR 05 12573**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **11.04.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **11.04.2011**

(73) Titular/es: **Etat Français Represente par le Delegue General pour l'Armement**
DGA/DSP/SREA/BPI
16 Bis, avenue Prieur de la Côte d'or
94114 Arcueil Cédex, FR

(72) Inventor/es: **Fusai, Thierry**

(74) Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 356 559 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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fabricación de un complejo entre doxiciclina y albúmina sérica bovina y su aplicación a la fabricación de un anticuerpo antidoxiciclina

La invención se refiere a la investigación de la doxiciclina en la orina o el plasma humano o animal.

Más en particular, la invención se refiere a la preparación de un hapteno compuesto por doxiciclina unida a albúmina sérica bovina (BSA) para permitir la producción de anticuerpo antidoxiciclina con el fin de detectar la doxiciclina por una reacción inmunológica.

La doxiciclina es un antibiótico de la clase de las tetraciclinas de segunda generación y se usa, sobre todo, para el tratamiento y la quimioprofilaxis antipalúdica.

Se trata de la desoxi-6-hidroxi-5 tetraciclina, de fórmula bruta $C_{22}H_{24}N_2O_8$.

Desde 2002, en los ejércitos, la prevención del paludismo resistente a la cloroquina se garantiza en parte por el uso de la doxiciclina a razón de 100 mg al día. Actualmente, la verificación de la observancia de esta quimioprofilaxis se apoya en la implementación de la dosificación en las orinas o el plasma de la doxiciclina mediante técnicas complejas que necesitan un laboratorio equipado con cromatógrafo líquido de alto rendimiento (HPLC).

Evidentemente, este procedimiento no puede usarse sobre el terreno. Ahora bien, para permitir una gestión adaptada de la molécula, parece indispensable que los médicos de unidad y la dirección dispongan de una prueba inmediata de seguimiento de la toma de doxiciclina.

Existen pruebas inmunológicas en forma de kits para la detección de tetraciclinas, comercializados con la marca RIDASCREEN por la empresa Charm Sciences Inc.

Estas pruebas se basan en el reconocimiento de un antígeno por un anticuerpo.

El antígeno proviene del acoplamiento de la tetraciclina con una proteína. Sin embargo, la revelación del anticuerpo se hace por medios ópticos y necesita el empleo de un espectrofotómetro. Además, estos kits se limitan a la detección de las tetraciclinas en general con fines alimentarios (en la leche, la miel, la carne) y no están adaptados a una detección sensible en el hombre o el animal.

Finalmente, estos kits sólo permiten administrar ciertas tetraciclinas (tetraciclina, clortetraciclina, minociclina, rolitetraciclina, oxitetraciclina), pero no doxiciclina. En el Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1980, 217, 1, 10-14, Bahjat A., Faraj y Farouk M. Ali describen un antisuero contra la tetraciclina producido en conejos inmunizados por un hapteno formado por tetraciclina conjugado

con BSA. Este antisuero es muy selectivo, por lo cual secundariamente sólo reacciona con la clortetraciclina y su reactividad secundaria con otras tetraciclinas, entre ellas la doxiciclina, es insignificante (1%). La detección se realiza por marcado radioactivo de las moléculas.

El hapteno se prepara por una reacción de Mannich, poniendo en contacto tetraciclina con BSA, en presencia de formaldehído.

Se sabe aplicar la reacción de Mannich a compuestos de la familia de las tetraciclinas, cuya estructura general se representa en la fig. 1 a continuación, haciéndolos reaccionar con formaldehído y aminoácidos. La patente estadounidense 3.042.716 describe derivados aminoalquilados obtenidos por simple puesta en contacto en medio acuoso y a temperatura ambiente de estos compuestos con formaldehído y un aminoácido como, por ejemplo, lisina. Las tetraciclinas tienen en común un esqueleto de naftaceno constituido por 4 ciclos bencénicos (A, B, C, D). La alquilación tiene lugar en el grupo amida situado en posición 2 del ciclo A. Estos nuevos compuestos presentan una mejor solubilidad y una mejor absorción gastrointestinal.

Por el contrario, en la publicación de Bahjat y col., el átomo de hidrógeno situado en posición 9 del ciclo D es el que está implicado en la reacción.

Está indicado que en la especificidad del antisuero resultante influyen diversos factores, como el tamaño del puente entre el hapteno y la proteína portadora, los grados de libertad del sitio de enlace del hapteno. La reactividad del anticuerpo con respecto a otros compuestos de la familia de las tetraciclinas por sustituyentes en el núcleo es directamente proporcional a su proximidad con la del hapteno. La mayor afinidad del anticuerpo por el hapteno corresponde a la zona más alejada del sitio de unión de la proteína. La introducción de un grupo hidroxilo en posición 5 del núcleo B, como en la doxiciclina (desoxi-6-hidroxi-5 tetraciclina), cuya fórmula desarrollada se representa en la fig. 2 más adelante, reduce considerablemente la afinidad de estos compuestos por el anticuerpo. El objeto de la presente invención es la puesta a punto de un procedimiento de identificación de la doxiciclina en la orina o el plasma del hombre o el animal que pueda usarse sin necesitar de aparatos complejos, y que sea rápido, específico, sensible y poco oneroso.

Para ello, se ha tenido la idea de crear un compuesto antigénico capaz de inducir la producción de anticuerpo antidoxiciclina. La invención tiene por objeto un procedimiento de fabricación de un hapteno entre un derivado de tetraciclina y albúmina sérica bovina mediante una reacción de Mannich, **caracterizado porque** el derivado de la tetraciclina es doxiciclina y porque el procedimiento comprende las etapas siguientes:

a) disolución de la doxiciclina y de la albúmina sérica bovina en presencia de formaldehído a un pH comprendido entre 4 y 5,

b) incubación de la mezcla de la etapa precedente a una temperatura comprendida entre 25°C y 50°C durante una duración igual o superior a 12 horas,

c) purificación y aislamiento de la doxiciclina acoplada a la BSA mediante paso en una columna de desalación de la mezcla de reacción de la etapa precedente.

Según una forma de realización optimizada, la incubación se efectúa a una temperatura de 40°C durante 12 horas. La etapa a) se realiza a un pH de 4,7.

La invención tiene igualmente por objeto el uso del hapteno fabricado según la invención para la identificación de la doxiciclina en la orina del hombre o el animal.

Como se indica en el artículo de Bahjat y col. citado anteriormente, en las mismas condiciones experimentales, la identificación, por este procedimiento, de la doxiciclina es 100 veces menos sensible en relación con la sensibilidad de la tetraciclina.

Por tanto, ha sido necesario poner a punto las condiciones de funcionamiento particulares, como la acidez del medio y la temperatura, para obtener un rendimiento de acoplamiento entre la doxiciclina y la BSA aceptable. El rendimiento de acoplamiento se ha estimado mediante la dosificación de la doxiciclina libre antes y después del acoplamiento.

La doxiciclina posee un hidrogeno reactivo en la posición 9 del ciclo D. Este último puede reaccionar con un aminoácido en presencia de formaldehído según una reacción de Mannich. La reacción tiene lugar en particular con los residuos de lisina presentes en gran número (9% de los aminoácidos) de la BSA. Se obtiene así un polímero de doxiciclina-BSA.

Este polímero es una estructura antigénica capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos antidoxiciclina. La invención se comprenderá mejor con ayuda de los siguientes ejemplos de realización.

<u>Ejemplo de fabricación de un hapteno doxiciclina-BSA según la invención:</u>

Se usan 2 mg de BSA catiónica liofilizada rica en lisina conocida con la denominación comercial SuperCarrier Immune Modulator fabricado por la empresa PIERCE.

Se disuelve este liofilizado en 200 μl de agua ultrapura MilliQ® fabricada por la empresa Millipore. Se obtiene una solución de BSA a 10 mg/l que contiene MES [Ácido (N-morfolino)-2-etanosulfónico] 0,1 M, NaCl 0,15 M, agentes de estabilización, a pH 4,7.

Se disuelven 5 mg de clorhidrato de doxiciclina fabricado por la empresa SIGMA en 200 μl de una solución de tampón de enlace que comprende MES 100 M, NaCl 0,15 M, de pH 4,7.

Se mezclan los 200 μl de BSA con los 200 μl de doxiciclina.

Se añaden a la mezcla 50 μl de una solución que contiene el 37% de formaldehído fabricada por la empresa SIGMA.

Se incuba la mezcla de reacción a 40°C durante 12 horas.

Se usa una columna de desalación D-Salt® Dextran Plastic Desalting Column fabricada por la empresa PIERCE y se equilibra con 5 ml de una solución de tampón de purificación que contiene PBS 6 mM, NaCl 150 mM, de pH 7,2.

Se deposita en la columna la totalidad de la mezcla de reacción.

Se recupera la totalidad de la muestra en un primer tubo (fracción no cribada).

Se deposita sucesivamente, siempre en el centro de la columna, 17 veces 1 ml de tampón de purificación.

Se recogen cada vez las fracciones que salen de la columna en los tubos numerados del 2 al 18.

Se dosifica la proteína para identificar las fracciones de interés. La estimación del rendimiento de este acoplamiento se ha realizado por cromatografía de alta presión (HPLC).

El cálculo del rendimiento se realiza mediante la dosificación de la doxiciclina libre.

Se han realizado dos series de acoplamientos y se ha comparado la dosificación de la doxiciclina libre en cada muestra con respecto a una muestra en blanco que corresponde a la purificación de la doxiciclina en ausencia de BSA.

Los resultados figuran en la tabla mostrada a continuación.

Fracción	**Serie 1 (μg/ml)**	**Serie 2 (μg/ml)**	**Blanco sin BSA (μg/ml)**
1	0,00	0,00	0
2	0,00	0,00	0
3	0,00	1,18	0
4	1,36	2,24	2,23
5	3,63	4,64	145,579
6	25,14	3,72	451,355
7	41,34	30,56	626,279
8	15,86	36,84	1.170,285
9	23,82	10,80	1.045,282
10	9,85	28,24	684,039
11	18,21	9,13	277,967

12	12,51	50,16	111,416
13	55,82	66,24	34,145
14	41,07	51,88	16,174
15	39,44	44,56	7,183
16	38,88	28,88	5,044
17	19,85	19,20	2,924
18	23,93	13,14	1,875
Total	370,73	401,41	4.581,777

El rendimiento varía entre el 81% y el 87,5%, como se indica en la tabla siguiente.

Serie	Cantidad de doxiciclina libre (μl)	Rendimiento (%)
1	370,73 (± 10%)	81,0
2	401,41 (± 10%)	87, 5
Blanco sin BSA	4.580	

A continuación se ha buscado la validación de la hipótesis de una respuesta antidoxiciclina inmunizando ratones, según el protocolo descrito a continuación.

Ensayo de inmunización:

Se ha procedido a un ensayo de inmunización en un lote de ratones.

Los ratones han recibido cada uno 4 inyecciones intraperitoneales, con un mes de intervalo, de 500 μl de una suspensión que contiene 100 μg/ml de BSA-doxiciclina y de alumbre al 50% en volumen.

El análisis de la respuesta después de la última inyección se ha realizado a partir de una prueba ELISA de la forma siguiente.

Se ha sensibilizado una placa de microvaloración con una solución que contiene 10 μ/ml en 50 μl/pocillos de BSA-doxiciclina en presencia de tampón carbonato/bicarbonato durante 12 horas a 4°C.

Los sueros de los ratones inmunizados se han incubado durante 2 horas a 37°C en una dilución de 1/500, 1/1.000 ó 1/1.500 en solitario o en presencia de una solución de doxiciclina de concentración decreciente a partir de 40 μg/ml,

respectivamente, 40, 20, 10, 5 μg/ml.

Finalmente, la revelación se ha realizado mediante un anticuerpo antirratón conjugado con peroxidasa.

Los resultados se ilustran en la fig. 3 más adelante en la que las T^+ representan los testigos positivos sin doxiciclina libre y las T^- representan los testigos negativos, es decir, los pocillos no sensibilizados.

La caída de la respuesta en presencia de doxiciclina libre (evaluada en densidad óptima DO) muestra que en el transcurso de las inmunizaciones, se ha obtenido una respuesta antidoxiciclina específica en el ratón, lo que valida la construcción y la hipótesis.

Ejemplo de preparación de soluciones para la dosificación urinaria de doxiciclina en el hombre:

Se recuerda que la doxiciclina se usa en la profilaxis del paludismo resistente a la cloroquina con posología de 100 mg/día.

Para una toma de 200 mg, el pico sérico es de 3 μg/ml.

La concentración residual a 24 horas es de 1 μg/ml.

La vida media sérica es de 16 a 24 horas.

El enlace con las proteínas es superior al 85%.

La concentración urinaria es 10 veces más elevada que la concentración en la sangre en el mismo instante.

Se preparan soluciones de doxiciclina de dilución creciente que contienen respectivamente 100, 85, 75, 60, 50, 25, 20, 10 μg/ml, a partir de una solución madre obtenida disolviendo 10,8 mg de doxiciclina HCl en 10 ml de agua ultrapura MilliQ® fabricada por la empresa Millipore.

Las soluciones hijas se reparten en partes alícuotas por volumen de 2 ml y se ponen a -80°C.

La preparación de las muestras de orina se realiza por centrifugación de las orinas a 4.000 vueltas/min durante 5 minutos, y después dilución a 1/20 (50 μl de muestra en 1 ml de agua ultrapura).

Se inyectan 80 μl de las diluciones a 1/20 preparadas anteriormente en un cromatógrafo HPLC.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de un complejo de un hapteno y de una molécula porosa entre un derivado de tetraciclina y albúmina sérica bovina por una reacción de Mannich, **caracterizado porque** el derivado de la tetraciclina es la doxiciclina y porque el procedimiento comprende las etapas siguientes:

a) disolución de la doxiciclina y de la albúmina sérica bovina en presencia de formaldehído a un pH comprendido entre 4 y 5,

b) incubación de la mezcla de la etapa precedente a una temperatura comprendida entre 25°C y 50°C durante un periodo igual o superior a 12 horas,

c) purificación y aislamiento de la doxiciclina acoplada a la BSA por paso en una columna de desalación de la mezcla de reacción de la etapa precedente.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la incubación se efectúa a una temperatura de 40°C durante 12 horas.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la etapa a) se realiza a un pH de 4,7.

4. Uso de un complejo de un hapteno y de una molécula portadora fabricado según las reivindicaciones 1 a 3 para la producción de un anticuerpo antidoxiciclina que permite, mediante una reacción inmunológica, la identificación de la doxiciclina en la orina o el plasma del hombre o el animal.

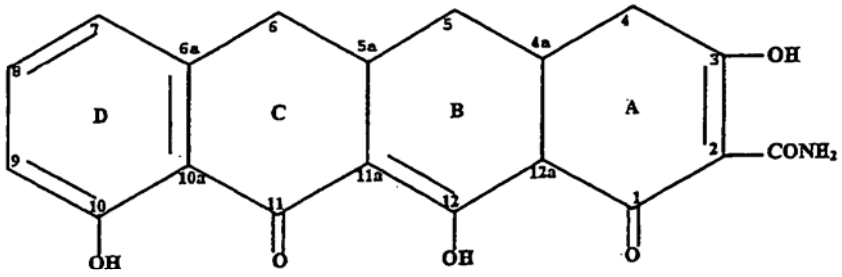

Fig. 1

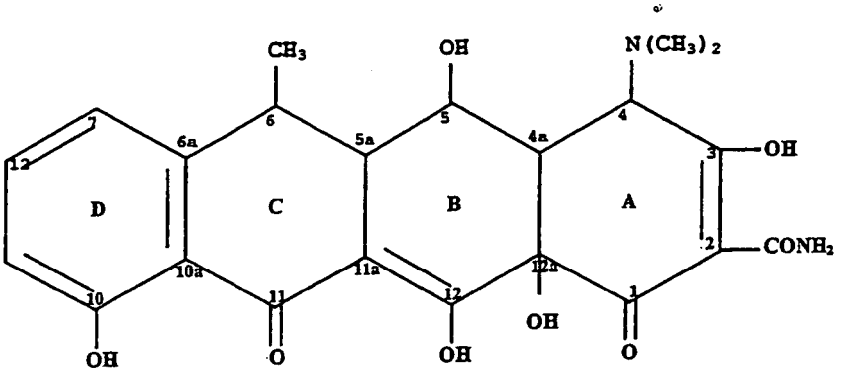

Fig. 2

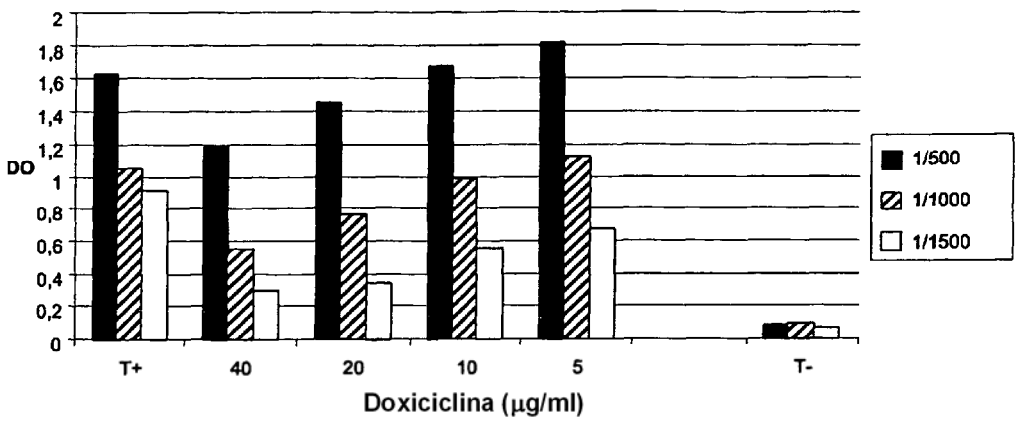
2
1,8
1,6
1,4
1,2
DO
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
T+
40
20
10
5
T-
Doxiciclina (µg/ml)
1/500
1/1000
1/1500

FIG .3

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante pretende únicamente servir de ayuda al lector y no forma parte del documento de patente europeo. Aun cuando se ha puesto el máximo esmero en su elaboración, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US-3.042.716-A **[0012]**

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- **Bahjat A.; Faraj; Farouk M. Ali.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1980, vol. 217 (1), 10-14 **[0010]**