



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 249**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 1/13 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07D 305/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06738937 .9**

96 Fecha de presentación : **20.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1875237**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54

Título: **Inmunoensayo de docetaxel.**

30

Prioridad: **22.03.2005 US 87008**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

73

Titular/es: **SALADAX BIOMEDICAL Inc.**
115 Research Drive, Jordan Hall
Bethlehem, Pennsylvania 18015, US

72

Inventor/es: **Salamone, Salvatore;**
Courtney, Jodi, Blake;
Stocker, Dennis;
Eisohly, Mahmoud, Ahmed y
Gul, Waseem

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 249 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

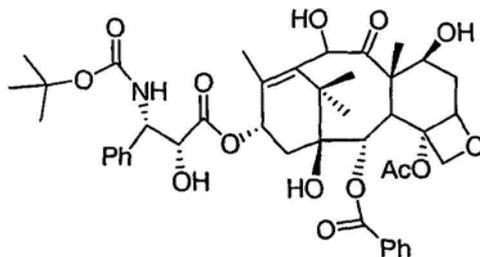
CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de los ensayos inmunológicos para determinar la presencia y/o cuantificar la cantidad de docetaxel en fluidos biológicos humanos para determinar rápidamente las concentraciones óptimas de fármaco durante quimioterapia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El cáncer es un término usado para describir un grupo de malignidades que comparten todas el rasgo común de desarrollarse cuando las células en una parte del cuerpo empiezan a crecer sin control. La mayoría de los cánceres se forman como tumores, pero también pueden manifestarse en la sangre y circular a través de otros tejidos donde crecen. Las malignidades cancerosas se tratan de la forma más habitual con una combinación de cirugía, quimioterapia, y/o radioterapia. El tipo de tratamiento usado para tratar un cáncer específico depende de varios factores que incluyen el tipo de malignidad cancerosa y la fase durante la cual se ha diagnosticado.

15 El Taxotere, cuyo nombre químico es docetaxel, es un agente citotóxico común usado para el tratamiento de cáncer de mama, de próstata independiente de andrógenos y de pulmón macrocítico. El docetaxel, que también se conoce como Taxotere, tiene la fórmula:

**I**

20 Este compuesto se ha asociado con efectos secundarios debilitantes tales como pérdida de densidad de la médula ósea, reacción alérgica, neutropenia, náuseas y vómitos. Controlando los niveles de docetaxel en el cuerpo y ajustando la dosis, pueden controlarse y limitarse mejor estos efectos secundarios en los pacientes.

25 Al mismo tiempo, a menudo existe una relación muy variable entre la dosis de docetaxel y la concentración sérica resultante del fármaco que afecta al efecto terapéutico. El grado de variabilidad farmacocinética intra- e inter-individual del docetaxel puede ser tan alto como de factor 4 y está afectado por mucho factores, incluyendo:

- Función orgánica
- Regulación genética
- 30 ○ Patología
- Edad
- Interacción fármaco-fármaco
- Tiempo de ingestión del fármaco
- Modo de administración del fármaco
- 35 ○ Administración relacionada con la técnica

40 Como resultado de esta variabilidad, dosis iguales del mismo fármaco en diferentes individuos pueden provocar resultados clínicos drásticamente diferentes (Hon y col. Clinical Chemistry 44, pág. 388-400, 1998). La eficacia de la misma dosificación de docetaxel varía significativamente en base a la eliminación individual del fármaco y la concentración sérica final del fármaco en el paciente. La gestión del fármaco terapéutico proporcionaría al médico una apreciación sobre la variación en el paciente con administración intravenosa del fármaco. Con la gestión del fármaco terapéutico, podrían individualizarse las dosificaciones del fármaco para el paciente, y serían mucho mayores las posibilidades de tratar de forma eficaz el cáncer, sin los efectos secundarios indeseados.

Además, la gestión del fármaco terapéutico de docetaxel serviría como excelente herramienta

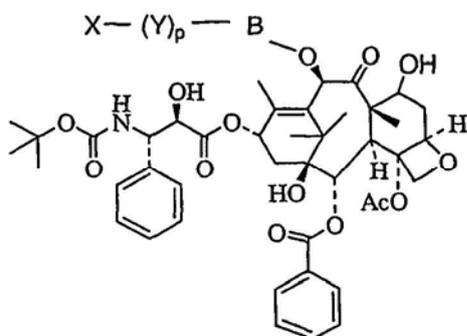
para asegurar el acatamiento en la administración de quimioterapia con la dosificación prescrita real y la consecución de los niveles séricos eficaces de concentración. Se ha descubierto que la variabilidad en la concentración sérica no se debe solamente a factores fisiológicos, sino que también pueden ser el resultado de la variación en la técnica de administración.

5 La gestión rutinaria del fármaco terapéutico de docetaxel requeriría la disponibilidad de ensayos automatizados simples adaptables al equipo general de laboratorio. Los ensayos que mejor se ajustan a estos criterios son los inmunoensayos. Para que sea un inmunoensayo eficaz, tendrán que desarrollarse anticuerpos que sean reactivos con la forma activa del fármaco. Actualmente no hay inmunoensayos disponibles para determinar los niveles de docetaxel en plasma o sangre. Grothaus, P. y col., J. Nat Prod, 10 1995, Vol. 58, pág. 1003-1014 da a conocer un anticuerpo específico de taxano genérico (SAIO) que también detecta el docetaxel.

SUMARIO DE LA INVENCION

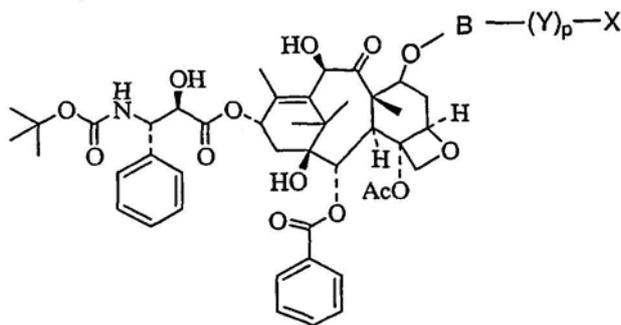
De acuerdo con esta invención, se ha producido una nueva clase de anticuerpos definidos en las reivindicaciones que son sustancialmente reactivos con el docetaxel para unirse al docetaxel.

15 Se ha descubierto que usando inmunógenos que son conjugados de un vehículo inmunogénico con un ligando seleccionado entre el grupo que consiste en derivados de 10-hidroxidocetaxel de fórmula:



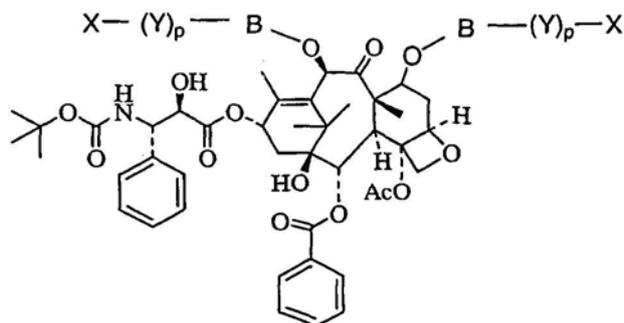
II-A;

20 derivados de 7-hidroxidocetaxel de fórmula:



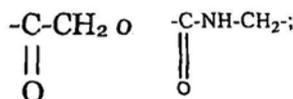
II-B;

25 derivados de 7,10-dihidroxidocetaxel de fórmula:



II-C

5 en las que B es $-\text{CH}_2-$;



10 Y es un grupo espaciador orgánico;

X es un grupo funcional capaz de unirse a un vehículo;

p es un número entero de 0 a 1; y

15 o mezclas de los mismos, se producen anticuerpos que son reactivos con el docetaxel. Proporcionar estos anticuerpos que reaccionan con el docetaxel permite producir un inmunoensayo que puede detectar y controlar específicamente el docetaxel en la muestras de fluido de pacientes que se están tratando con docetaxel. También se incluyen dentro de esta invención reactivos y kits para dicho inmunoensayo, como se define en las reivindicaciones.

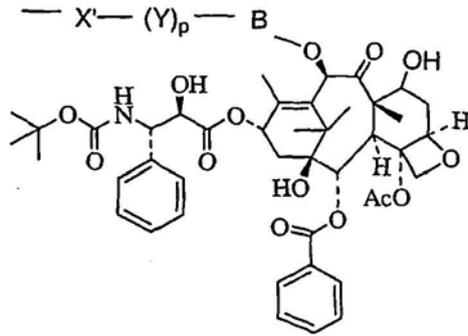
DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 De acuerdo con esta invención, se proporciona una nueva clase de anticuerpos que reaccionan con el docetaxel. Se ha descubierto que a través del uso de estos derivados de docetaxel de fórmula II-A, II-B o II-C o mezclas de los mismos; como inmunógenos, se proporciona esta nueva clase de anticuerpos de esta invención. Es a través del uso de estos anticuerpos que se ha desarrollado un inmunoensayo, incluyendo reactivos y kits para dicho inmunoensayo para detectar y/o cuantificar el docetaxel en muestras de sangre, plasma u otros fluidos corporales. Mediante el uso de este inmunoensayo, puede detectarse y/o cuantificarse la presencia y cantidad de docetaxel en muestras de fluido corporal, preferiblemente una muestra de sangre o plasma. De este modo, puede controlarse durante la terapia a un paciente que se está tratando con docetaxel y ajustarse el tratamiento de acuerdo con dicho control. Mediante esta invención se consigue la gestión del fármaco terapéutico de docetaxel en pacientes con cáncer que se están tratando con docetaxel como agente quimioterapéutico. Los anticuerpos preferidos son aquellos que son reactivos con el docetaxel y no reaccionan de forma cruzada sustancialmente con el taxol y compuestos relacionados con el docetaxel farmacéuticamente inactivos expedidos de 10-O-desacetilbaccatina III.

35 Los reactivos utilizados en el ensayo de esta invención son conjugados de un vehículo, preferiblemente que contiene grupos funcionales poliamina, con los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C o mezclas de los mismos. Estos conjugados son compañeros de unión competitiva con el docetaxel presente en la muestras por la unión con los anticuerpos de esta invención. Por lo tanto, la cantidad de reactivo conjugado que se une al anticuerpo será inversamente proporcional a la cantidad de docetaxel en la muestra. De acuerdo con esta invención, el ensayo utiliza cualquier medio de medición convencional para detectar y medir la cantidad de dicho conjugado que está unido o no unido al anticuerpo. A través del uso de dicho medio, puede determinarse la cantidad del conjugado unido o no unido. Generalmente, la

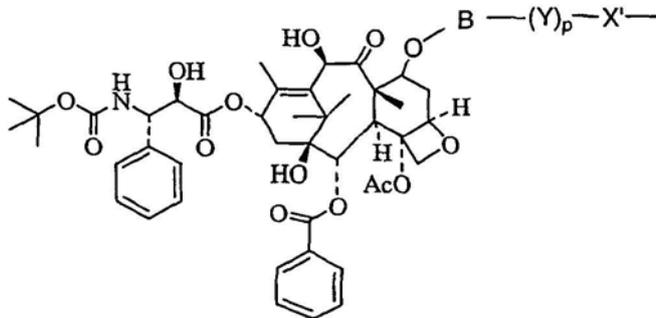
5 cantidad de docetaxel en una muestra se determina correlacionando la cantidad medida del conjugado unido o no unido producido por el docetaxel en la muestra con los valores de conjugado unido o no unido determinados a partir de las muestras de la curva patrón o de calibrado que contienen cantidades conocidas de docetaxel, estando dichas cantidades conocidas en el intervalo esperado para la muestra a ensayar. Estos estudios para producir curvas de calibrado se determinan usando el mismo procedimiento de inmunoensayo que el usado para la muestra.

10 Los conjugados, así como los inmunógenos, se preparan a partir de compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C o mezclas de los mismos. En los conjugados o inmunógenos, el vehículo y el polímero de poliamina se unen a partes de ligando de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C. Las partes de ligando tienen la fórmula:



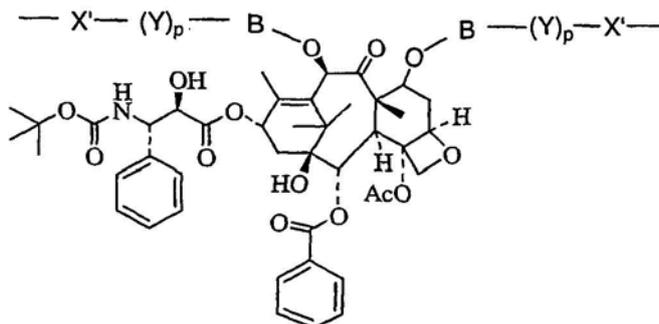
III-A

en la que Y, B y p son como anteriormente; y
 x' es -CH₂- o un grupo enlazador funcional;
 compuestos de fórmula:



III-B;

15 y compuestos de fórmula:



III-C

Estas partes de ligando pueden unirse a uno o más sitios activos en el vehículo

del conjugado o el inmunógeno. Generalmente, estos vehículos contienen polímeros, más preferiblemente polímeros de poliamina que tienen un grupo amino reactivo. En la formación de los conjugados, X es preferiblemente un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino. Cuando se usan los compuestos de fórmula II-A, II-B o II-C para crear inmunógenos, X en el compuesto de fórmula II-A, II-B y II-C es preferiblemente cualquier grupo funcional capaz de unirse o enlazarse a un polímero de poliamina.

Definiciones

En toda esta descripción, deben entenderse las siguientes definiciones:

10 El término "alquileno" indica un sustituyente de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada saturada divalente que contiene de uno a diez átomos de carbono. Los términos "inmunógeno" y "inmunogénico" se refieren a sustancias capaces de provocar, producir o generar una respuesta inmune en un organismo.

15 El término "conjugado" se refiere a cualquier sustancia formada a partir de unir dos partes. Los conjugados representativos de acuerdo con la presente invención incluyen aquellos formados por la unión de una molécula pequeña, tal como el compuesto de fórmula II-A, II-B y II-C y una molécula grande, tal como un vehículo, preferiblemente vehículos que comprenden un polímero de poliamina, particularmente una proteína. En el conjugado, la molécula pequeña puede unirse o enlazarse a uno o más sitios activos en la molécula grande. El término conjugado incluye el término inmunógeno. En los conjugados usados como reactivos, el vehículo puede ser cualquier vehículo y X puede ser cualquier grupo funcional que puede unirse a un vehículo. En el inmunógeno, el vehículo es un polímero de poliamina y X es cualquier grupo funcional capaz de unirse a un polímero de poliamina.

20 Los "haptenos" son antígenos parciales o incompletos. Son sustancias libres de proteína, principalmente sustancias de bajo peso molecular, que no son capaces de estimular la formación de anticuerpos, pero que reaccionan con los anticuerpos. Estos últimos se forman acoplado un hapteno a un vehículo inmunogénico de alto peso molecular y después inyectando este producto acoplado, es decir, el inmunógeno, en un sujeto humano o animal. El hapteno de esta invención es docetaxel.

25 Como se usa en este documento, un "grupo espaciador" o "espaciador" se refiere a una parte de una estructura química que conecta dos o más subestructuras tales como haptenos, vehículos, inmunógenos, marcadores, o indicadores a través de un grupo CH₂ o un grupo enlazador funcional. Estos grupos espaciadores se enumerarán posteriormente en esta solicitud. Los átomos de un grupo espaciador y los átomos de una cadena dentro del grupo espaciador están ellos mismos conectados por enlaces químicos. Entre los espaciadores preferidos están las cadenas de carbono, saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas. Estas cadenas de carbono también pueden incluir uno o más heteroátomos dentro de la cadena o en los extremo de las cadenas. Por "heteroátomos" se entienden átomos diferentes a carbono que se eligen entre el grupo constituido por oxígeno, nitrógeno y azufre. Los grupos espaciadores también pueden incluir grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos en la cadena.

30 La cantidad de átomos en el grupo espaciador se determina contando los átomos diferentes a hidrógeno. La cantidad de átomos en una cadena dentro de un grupo espaciador se determina contando la cantidad de átomos diferentes a hidrógeno a lo largo del trayecto más corto entre las subestructuras que se están conectando. Un grupo enlazador funcional puede usarse para activar, por ejemplo, proporcionar un sitio funcional disponible en, un hapteno o un grupo espaciador para sintetizar un conjugado de un hapteno con un marcador o vehículo o polímero de poliamina.

35 Un "vehículo inmunogénico", como se usa el término en este documento, es una sustancia inmunogénica, habitualmente una proteína, que puede unirse con un hapteno, en este caso docetaxel o los derivados de docetaxel descritos anteriormente en este documento, posibilitando de este modo que estos derivados de hapteno induzcan una respuesta inmune y provoquen la producción de anticuerpos que puedan unirse específicamente con estos haptenos. Los vehículos inmunogénicos y los grupos enlazadores se enumerarán posteriormente en esta solicitud. Entre las sustancias de vehículo inmunogénico se incluyen proteínas, glucoproteínas, poliamino-polisacáridos complejos, partículas, y ácidos nucleicos que se reconocen como foráneos y de este modo provocan una respuesta inmunológica en el huésped. Los poliamino-polisacáridos pueden prepararse a partir de polisacáridos usando cualquier medio convencional conocido para esta preparación.

40 También pueden emplearse diversos tipos de proteínas como vehículo inmunogénico de poli(aminoácido). Estos tipos incluyen albúminas, proteínas séricas, lipoproteínas, etc. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), ovalbúmina del huevo, tiroglobulina bovina (BTG) etc. Como alternativa, pueden utilizarse poli(aminoácidos) sintéticos.

Los vehículos inmunogénicos también pueden incluir poliamino-polisacáridos, que son polímeros de alto peso molecular compuestos por condensaciones repetidas de monosacáridos. Ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa, gomas de carbohidrato tales como goma arábiga, goma de agar, y similares. El polisacárido también contiene restos poliaminoacídicos y/o restos lipídicos.

5 El vehículo inmunogénico también puede ser un poli(ácido nucleico) solo o conjugado con uno de los poli(aminoácidos) o polisacáridos mencionados anteriormente.

10 El vehículo inmunogénico también puede incluir partículas sólidas. Las partículas son generalmente de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros (μm) y no más de aproximadamente 100 μm , y habitualmente de aproximadamente 0,05 μm a 10 μm de diámetro. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, óptimamente de una densidad aproximada a la del agua, generalmente de aproximadamente 0,7 a 1,5 g/ml, y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente, u opaca. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, incluyendo, sin limitación, ejemplos tales como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, y virus. Las partículas también pueden estar compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, látex, vesículas de fosfolípidos, o lipoproteínas.

20 "Poli(aminoácido)" o "polipéptido" es una poliamida formada de aminoácidos. Un poli(aminoácido) generalmente variará entre un peso molecular de aproximadamente 2.000, no teniendo un límite superior de peso molecular, siendo normalmente menor de 10.000.000 y habitualmente de no más de aproximadamente 600.000 dalton. Habitualmente habrá diferentes intervalos, dependiendo de si está implicado un vehículo inmunogénico o una enzima.

25 Un "péptido" es cualquier compuesto formado por la unión de dos o más aminoácidos por enlaces amida (peptídicos), habitualmente un polímero de α -aminoácidos en el que el grupo α -amino de cada resto aminoacídico (excepto el extremo NH_2) está unido al grupo α -carboxilo del siguiente resto en una cadena lineal. Los términos péptido, polipéptido y poli(aminoácido) se usan como sinónimos en este documento para hacer referencia a esta clase de compuestos sin restricción en cuanto al tamaño. Los miembros más grandes de esta clase se conocen como proteínas.

30 Un "marcador", "molécula detectora", o "indicador" es cualquier molécula que produce, o pueden inducirse a producir, una señal detectable. El marcador puede conjugarse con un analito, inmunógeno, anticuerpo, u otra molécula tal como un receptor o una molécula que puede unirse a un receptor tal como un ligando, particularmente un hapteno. Los ejemplos no limitantes de marcadores incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fragmentos enzimáticos, sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, coenzimas, catalizadores, fluoróforos, colorantes, quimioluminiscentes, luminiscentes, o sensibilizantes; una partícula no magnética o magnética, un soporte sólido, un liposoma, un ligando, o un receptor.

35 El término "anticuerpo" se refiere a un compañero de unión de proteína específico para un antígeno y es cualquier sustancia, o grupo de sustancias, que tiene una afinidad de unión específica para un antígeno con exclusión de otras sustancias. El término genérico anticuerpo abarca anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo.

40 El término "derivado" se refiere a un compuesto químico o molécula creada a partir de un compuesto precursor por una o más reacciones químicas.

45 El término "vehículo" se refiere a partículas sólidas y/o polímeros poliméricos tales como polímeros inmunogénicos tales como los mencionados anteriormente. Cuando el vehículo es una partícula sólida, la partícula sólida puede unirse, revestirse con o unirse de otro modo al material polimérico que preferiblemente es un polímero de poliamina para proporcionar uno o más sitios reactivos para la unión al grupo funcional terminal X en los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C.

50 El término "kit de reactivos", o "kit de ensayo", se refiere a un conjunto de materiales que se usa para realizar un ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse envasados en combinación en el mismo recipiente o en diferentes recipientes, dependiendo de sus reactividades cruzadas y estabilizadas, y en forma líquida o liofilizada. Las cantidades y proporciones de reactivos proporcionadas en el kit pueden seleccionarse para proporcionar resultados óptimos para una aplicación particular. Un kit de reactivos que contiene las características de la presente invención comprende anticuerpos específicos para el docetaxel. El kit puede comprender adicionalmente ligandos del analito y materiales de calibrado y control. Los reactivos pueden permanecer en forma líquida o pueden liofilizarse.

55 La expresión "materiales de calibrado y control" se refiere a cualquier material de patrón o referencia que contiene una cantidad conocida de un fármaco a medir. La concentración del fármaco se calcula comparando los resultados obtenidos para la muestra desconocida con los resultados obtenidos para el patrón. Esto se hace habitualmente construyendo una curva de calibrado.

El término "muestra biológica" incluye, aunque sin limitación, cualquier cantidad de una sustancia

de un ser vivo o ser anteriormente vivo. Dichos seres vivos incluyen, aunque sin limitación, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos, caballos, y otros animales. Dichas sustancias incluyen, aunque sin limitación, sangre, suero, plasma, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, linfa, ganglios linfáticos, tejido sinovial, condrocitos, macrófagos sinoviales, células endoteliales, y piel.

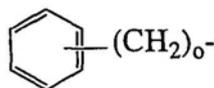
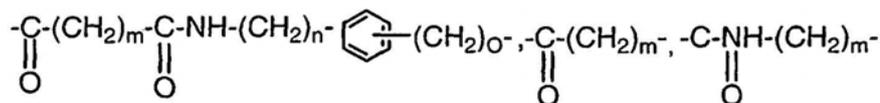
5 Reactivos e inmunógenos

En la construcción de un inmunoensayo, se construye un conjugado de docetaxel para que compita con el docetaxel en la muestra por los sitios de unión en los anticuerpos. En el inmunoensayo de esta invención, los reactivos son conjugados de un vehículo con a) los derivados de docetaxel 10-sustituídos de los compuestos de fórmula II-A; b) los derivados de 7-docetaxel de fórmula II-B y c) los derivados de docetaxel 7,10-disustituídos de fórmula II-C o mezclas de los mismos. En los compuestos de fórmula III-A, III-B y III-C, el espaciador enlazador constituye la parte "-B-(Y)_p-X'" de esta molécula. El enlazador X' y el espaciador "-B-(Y)_p-" son convencionales para la preparación de conjugados e inmunógenos. Puede utilizarse cualquier grupo espaciador-enlazador convencional utilizado para preparar conjugados e inmunógenos para inmunoensayos en los compuestos de fórmula III-A, III-B y III-C.

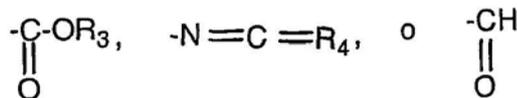
15 Dichos enlazadores y espaciadores convencionales se describen en la patente de Estados Unidos 5.501.987 y la patente de Estados Unidos 5.101.015.

Entre los grupos espaciadores preferidos se incluyen los grupos espaciadores mencionados anteriormente en este documento. Los grupos espaciadores particularmente preferidos son grupos tales como alquileo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

20 en el que n y o son números enteros de 0 a 6, y m es un número entero de 1 a 6 siendo alquileo el grupo espaciador especialmente preferido.



25 En los compuestos de fórmula III-A, III-B y III-C, X' es -CH₂- o un grupo funcional que une el espaciador al vehículo, preferiblemente a un grupo amina en el vehículo polimérico. El grupo X' es el resultado del grupo funcional terminal X en los compuestos de Fórmula II-A, II-B y II-C que es capaz de unirse a un vehículo, preferiblemente al grupo amino en el polímero de poliamina presente en el vehículo o usado como inmunógeno. Puede utilizarse cualquier grupo funcional terminal capaz de unirse a un vehículo, preferiblemente capaz de reaccionar con una amina como grupo funcional X en los compuestos de fórmula II-A, II-B, y II-C. Estos grupos funcionales terminales preferiblemente incluidos dentro de X son:



30 en los que R₃ es hidrógeno o tomado junto con su átomo de oxígeno unido forma un éster reactivo y R₄ es oxígeno o azufre. El radical -N=C=R₄, puede ser un isocianato o un isotiocianato. Los ésteres activos formados por OR₃ incluyen imidoéster, tal como N-hidroxisuccinamida, 1-hidroxibenzotriazol y p-nitrofenil éster. Sin embargo, puede usarse cualquier éster activo que pueda reaccionar con un grupo amina.

35 El grupo carboxílico y los ésteres activos se acoplan al vehículo o el polímero inmunogénico por medios convencionales. El grupo amina del polímero de poliamina, tal como una proteína, produce un grupo amida que conecta el espaciador al polímero, inmunógenos o el vehículo y/o conjugados de esta descripción. Por otro lado, los vehículos pueden revestirse con un polímero de poliamina para aportar el grupo amino para la unión a la parte de ligando.

En los inmunógenos y conjugados de la presente descripción, los enlaces químicos entre los haptenos de docetaxel que contienen el grupo carboxilo y los grupos amino del polímero de poliamina en el vehículo o inmunógeno pueden establecerse usando una diversidad de procedimientos conocidos por un especialista en la técnica. Es frecuentemente preferible formar enlaces amida. Los enlaces amida se forman activando primero el resto de ácido carboxílico del hapteno de docetaxel en los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C haciendo reaccionar el grupo carboxi con un reactivo de grupo saliente (por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol, p-nitrofenol y similares). Puede usarse un reactivo de activación tal como dicitlohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida y similares. La forma activada del grupo carboxilo en el hapteno de docetaxel de fórmula II-A, II-B y II-C después se hace reaccionar con una solución tamponada que contiene el vehículo proteico.

En casos en los que el derivado de docetaxel de fórmula II-A, II-B y II-C contiene un grupo amino primario o secundario así como el grupo carboxilo, es necesario usarse un grupo protector de amina durante las reacciones de activación y acoplamiento para evitar que los conjugados reaccionen consigo mismos. Típicamente, las aminas del conjugado se protegen formando la correspondiente estructura N-trifluoroacetamida, N-terc-butiloxicarbonil uretano (N-t-BOC uretano), N-carbobenciloxi uretano o similar. Una vez se ha conseguido la reacción de acoplamiento con el polímero inmunogénico o el vehículo, como se ha descrito anteriormente, el grupo protector de amina puede eliminarse usando reactivos que por lo demás no alteran la estructura del inmunógeno o conjugado. Dichos reactivos y procedimientos son conocidos para los especialistas en la técnica e incluyen ácidos acuosos o anhídros débiles o fuertes, bases acuosas o anhídros débiles o fuertes, reactivos que contienen hidruro tales como borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico e hidrogenación catalítica. También se describen diversos procedimientos para conjugar haptenos y vehículos en la patente de Estados Unidos 3.996.344 y la patente de Estados Unidos 4.016.146.

Por otro lado, cuando X es un radical isocianato o isotiocianato terminal en el compuesto de fórmula II-A, II-B y II-C, estos radicales cuando reaccionan con la amina libre de un polímero de poliamina producen el conjugado o el inmunógeno en el que X' es,



en las partes de ligando de fórmula III-A, III-B y III-C, conectan funcionalmente con el grupo amino en el vehículo que contiene poliamina o el polipéptido inmunogénico.

Cuando X, en los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C, es un grupo aldehído, estos compuestos pueden conectarse al grupo amina del polipéptido de poliamina o vehículo a través de un enlace amina por aminación reductora. Puede usarse cualquier procedimiento convencional para condensar un aldehído con una amina tal como a través de aminación reductora para formar este enlace. En este caso, X' en las partes de ligando de fórmula III-A, III-B y III-C es $-\text{CH}_2-$.

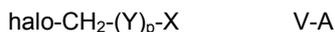
En la preparación de los 7- y 10-monoderivados de fórmula II-A y II-B y los derivados 7,10-disustituidos de docetaxel, el grupo 2'-hidroxi del docetaxel primero se protege. Este grupo 2'-hidroxi está en la cadena lateral que cuelga de la posición 13 en la estructura anular del docetaxel. Éste es el más reactivo de los grupos hidroxilo en el docetaxel. Puede utilizarse cualquier procedimiento convencional para proteger un grupo hidroxilo tal como por esterificación para proteger este grupo en la posición 2', dejando al mismo tiempo los grupos hidroxilo en las posiciones 7 y 10 libres para la reacción. Puede utilizarse cualquiera de los grupos protectores de hidroxilo convencionales para conseguir este propósito. Un grupo protector de hidroxilo preferido es el grupo éster alilortoformiato que se forma haciendo reaccionar el compuesto de fórmula I con alilcloroformiato por medios convencionales bien conocidos en la técnica. Éste es un grupo protector producido fácilmente que puede eliminarse fácilmente en una fase posterior del procedimiento.

Después de proteger el grupo 2'-hidroxi, este docetaxel protegido de fórmula I puede convertirse en el derivado 10-docetaxel de fórmula II-A, el derivado 7-docetaxel de fórmula II-B o el derivado 7,10-docetaxel de fórmula II-C dependiendo de la cantidad molar de los reactivos utilizados para reaccionar con el docetaxel 2'-protegido de fórmula I. En general, cuando se hace reaccionar un exceso molar del reactivo con el docetaxel 2'-protegido de fórmula I, el producto final resultante será una mezcla de los derivados 7-O y 10-O sustituidos, así como de los derivados 7,10-O disustituidos. Estos derivados pueden separarse usando una columna de gel de sílice y un gradiente que comprende diclorometano y acetato de etilo, generalmente diclorometano al 100% al principio mientras se añade gradualmente acetato de etilo a la columna. Los ingredientes individuales pueden recogerse y confirmarse su estructura por RMN.

En la realización de esta reacción. El grupo 7-hidroxi en el docetaxel 2'-hidroxi protegido

5 reaccionará primero con el reactivo tal como el compuesto de fórmula V-A. Por lo tanto, limitando la proporción del reactivo tal como el compuesto de fórmula V-A o VI que se hace reaccionar con el compuesto de fórmula I a aproximadamente 0,9 a 1,5 moles por mol, el producto final constará sustancialmente de los compuestos de fórmula II-B. Aumentando la proporción molar de los reactivos que reaccionan con el docetaxel 2'-hidroxi protegido de fórmula I se producirá más de los compuestos de fórmula II-A y II-C en el producto. Estos derivados pueden separarse del producto como se ha descrito anteriormente.

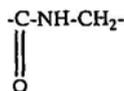
10 Los derivados 10 y 7-sustituídos de fórmula II-A y II-B en la que B es $-\text{CH}_2-$, así como los derivados 7,10-disustituídos de fórmula II-C se forman haciendo reaccionar el grupo 7 y 10-hidroxi del docetaxel con un haluro de fórmula:



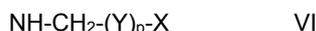
en la que p, Y y X son como anteriormente.

15 En la formación de estos derivados, puede utilizarse cualquier medio convencional para hacer reaccionar un alcohol para formar un éter en la condensación del compuesto de fórmula V-A con la posición 7-hidroxi en el docetaxel. El uso de un haluro en el compuesto de fórmula V-A proporciona un medio eficaz para formar un éter condensándolo con el alcohol. Por otro lado, cuando el compuesto de fórmula V-A contiene grupos funcionales, que pueden interferir con esta reacción para formar estos derivados, estos grupos funcionales pueden protegerse mediante grupos protectores adecuados que puede retirarse después de esta reacción como se ha descrito anteriormente en este documento.

Los derivados anteriores de fórmula II-A, II-B o II-C en la que B es

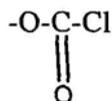


se producen haciendo reaccionar uno o más de los grupos hidroxi libres en el docetaxel 2' protegido con un compuesto amino de fórmula:



25 en la que X, Y y p son como anteriormente,

después convirtiendo primero el uno o más grupos hidroxi en el docetaxel 2' protegido en el grupo cloroformiato



30 Puede usarse cualquier medio convencional para convertir un grupo hidroxi en un grupo cloroformiato. Después de la formulación de un cloroformiato, el grupo halo del cloroformiato se condensa con el grupo amina en el compuesto de fórmula VI. Antes de esta reacción, el grupo reactivo en el docetaxel y/o en el compuesto de fórmula VI se protegen como se ha descrito anteriormente en este documento con un grupo protector convencional. Estos grupos protectores pueden retirarse después de esta condensación del haluro por medios convencionales tales como los descritos anteriormente en este documento.

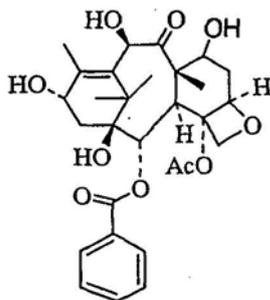
35 Los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C pueden convertirse en los inmunógenos y/o los reactivos conjugados de esta descripción haciendo reaccionar estos compuestos con un vehículo, preferiblemente un polipéptido poliamina o un vehículo revestido con un polipéptido de poliamina. Puede utilizarse el mismo polipéptido como vehículo y como polímero inmunogénico en el inmunógeno de esta descripción con la condición de las poliaminas o polipéptidos sean inmunológicamente activos. Sin embargo, para formar los conjugados usados como reactivos en el inmunoensayo, estos polímeros no tienen que producir una respuesta inmunológica, necesidad que sí tienen los inmunógenos. De acuerdo con esta invención, los diversos grupos funcionales representados por X en los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C pueden conjugarse con el vehículo por medios convencionales para unir un grupo funcional a un vehículo. De acuerdo con una realización preferida, en los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C, X es un grupo ácido carboxílico.

40

45

ANTICUERPOS

La presente invención también se refiere a nuevos anticuerpos incluyendo anticuerpos monoclonales contra docetaxel producidos utilizando los inmunógenos mencionados anteriormente. De acuerdo con esta invención, se ha descubierto que estos anticuerpos producidos de acuerdo con esta invención son reactivos con el docetaxel y no reaccionan sustancialmente con metabolitos de derivados de docetaxel que interferirían con los inmunoensayos para docetaxel. Además, los anticuerpos de esta invención no reaccionan sustancialmente con taxol (es decir, reactividad cruzada del 20% o menos), cuyo nombre químico es paclitaxel y compuestos tipo docetaxel tales como 10-O-desacetilbaccatina III que contiene la estructura anular del docetaxel o taxol. El compuesto 10-O-desacetilbaccatina III tiene la fórmula:



La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos y anticuerpos monoclonales contra docetaxel. Los antisueros de la invención pueden producirse convenientemente inmunizando animales huésped con los inmunógenos de esta invención. Los animales huésped adecuados incluyen roedores, tales como, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cobayas y similares, o mamíferos superiores tales como cabras, ovejas, caballos y similares. Las dosis iniciales, las extracciones de sangre y los refuerzos pueden darse de acuerdo con protocolos aceptados para provocar respuestas inmunes en animales. A través de la extracción de sangre periódica, se observaron las muestras de sangre de los ratones inmunizados para desarrollar una respuesta inmune contra la unión de docetaxel utilizando inmunoensayos convencionales. Estos procedimientos proporcionan un modo conveniente para explorar huéspedes y anticuerpos que están produciendo antisueros que tienen la actividad deseada. Los anticuerpos también se exploraron contra el taxol y se produjeron anticuerpos que no mostraron unión sustancial al taxol.

Se producen anticuerpos monoclonales de forma conveniente inmunizando ratones Balb/c de acuerdo con el programa seguido de la inyección a los ratones de inmunógeno adicional i.p. o i.v. en tres días sucesivos empezando tres días antes de la fusión celular. Por supuesto también pueden utilizarse otros protocolos bien conocidos en la técnica de anticuerpos. El protocolo completo de inmunización detallado en este documento proporcionó un protocolo óptimo para la respuesta de anticuerpos séricos para el anticuerpo contra docetaxel.

Pueden usarse linfocitos B obtenidos del bazo, sangre periférica, ganglios linfáticos u otro tejido del huésped como célula productora de anticuerpos monoclonales. Las más preferidas son linfocitos B obtenidos del bazo. Los hibridomas capaces de generar los anticuerpos monoclonales deseados de la invención se obtienen fusionando dichos linfocitos B con una línea celular inmortal, que es una línea celular que confiere estabilidad de cultivo tisular a largo plazo en la célula híbrida. En la realización preferida de la invención, la célula inmortal puede ser una célula linfoblastoide o una célula de plasmacitoma tal como una célula de mieloma. Se forman hibridomas murinos que producen anticuerpos monoclonales contra docetaxel por la fusión de células de mieloma de ratón y células esplénicas de ratones inmunizados con los conjugados inmunogénicos mencionados anteriormente. Pueden producirse anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados clonando los genes que expresan el anticuerpo de las células de hibridoma y empleando procedimientos de ADN recombinante ahora bien conocidos en la técnica para unir la subsecuencia de la región variable de ratón a las regiones constantes humanas o para combinar las regiones flanqueantes humanas con regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina de ratón o rata donante. Un procedimiento mejorado para realizar la humanización de anticuerpos monoclonales murinos que proporciona anticuerpos de afinidades potenciadas es expone en la solicitud de patente internacional WO 92/11018.

Pueden producirse fragmentos polipeptídicos que comprenden solamente una parte de la estructura primaria del anticuerpo, teniendo dichos fragmentos una o más actividades de inmunoglobulina. Estos fragmentos polipeptídicos pueden producirse por escisión proteolítica de anticuerpos intactos por procedimientos bien conocidos en la técnica, o insertando codones de parada en las localizaciones deseadas en vectores de expresión que contienen los genes de anticuerpo usando mutagénesis dirigida al sitio para producir fragmentos Fab o fragmentos (Fab)₂. Pueden producirse anticuerpos de cadena

sencilla uniendo regiones VL y VH con un enlazador de ADN (véase Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883 (1988) y Bird y col., Science, 242:423-426 (1988)).

5 Los anticuerpos de esta invención son reactivos con el docetaxel. Además, los anticuerpos no tienen ninguna reactividad cruzada sustancial con taxol o 10-O-desacetilbaccatina III. Por reactividad cruzada sustancial se entiende que los anticuerpos de esta invención tienen una reactividad cruzada relativa al docetaxel con taxol o 10-O-desacetilbaccatina III del 20% o menos.

INMUNOENSAYOS

10 De acuerdo con esta invención, los conjugados y los anticuerpos generados a partir de los inmunógenos de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C o mezclas de los mismos, pueden utilizarse como reactivos para la determinación de docetaxel en muestras de pacientes. Esta determinación se realiza mediante un inmunoensayo. Puede utilizarse cualquier inmunoensayo en el que los conjugados de reactivo formados a partir de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C compitan con el docetaxel en la muestra por sitios de unión en los anticuerpos generados de acuerdo con esta invención para determinar la presencia de docetaxel en la muestra de un paciente. El modo de realizar dicho ensayo para docetaxel 15 en una muestra que se sospecha que contiene docetaxel, comprende combinar (a) una muestra de medio acuoso, (b) un anticuerpo contra docetaxel generado de acuerdo con esta invención y (c) los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C o mezclas de los mismos. La cantidad de docetaxel en la muestra puede determinarse midiendo la inhibición de la unión al anticuerpo específico de una cantidad conocida del conjugado añadido a la mezcla de la muestra y el anticuerpo. El resultado de la inhibición de dicha unión de la cantidad desconocida de conjugados por la muestra conocida se compara con los resultados obtenidos en el mismo ensayo utilizando soluciones patrón conocidas de docetaxel. En la determinación de la cantidad de docetaxel en una muestra desconocida, la muestra, los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C y el anticuerpo pueden añadirse en cualquier orden.

25 Pueden utilizarse diversos medios para medir la cantidad de conjugado formado a partir de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C unido al anticuerpo. Un procedimiento es cuando la unión de los conjugados al anticuerpo causa una disminución en la tasa de rotación de un conjugado fluoróforo. La cantidad de disminución en la tasa de rotación de un conjugado fluoróforo en la mezcla líquida puede detectarse por la técnica de polarización fluorescente tal como se describe en la patente de Estados Unidos 4.269.511 y la patente de Estados Unidos 4.420.568.

30 Por otro lado, el anticuerpo puede revestirse o absorberse sobre nanopartículas de modo que cuando estas partículas reaccionan con los conjugados de docetaxel formados a partir de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C, estas nanopartículas forman un agregado. Sin embargo, cuando el anticuerpo revestido o absorbido sobre las nanopartículas reacciona con el docetaxel en la muestra, el docetaxel de la muestra unido a estas nanopartículas no causa agregación de las nanopartículas de anticuerpo. La cantidad de agregación o aglutinación puede medirse en la mezcla de ensayo por absorbancia.

35 Por otro lado, estos ensayos pueden realizarse teniendo el anticuerpo o los conjugados de docetaxel unidos a un soporte sólido tal como una placa de microtitulación o cualquier otro soporte sólido convencional incluyendo partículas sólidas. La unión de los anticuerpos y las proteínas a dichas partículas sólidas es bien conocida en la técnica. Puede utilizarse cualquier procedimiento convencional para realizar dichas uniones. En muchos casos, para ayudar a la medición, pueden ponerse marcadores sobre los anticuerpos, conjugados o partículas sólidas, tales como marcadores radiactivos o marcadores enzimáticos, como adyuvantes en la detección de la cantidad de conjugados formados a partir de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C que están unidos o no unidos con el anticuerpo. Otros marcadores adecuados incluyen cromóforos, fluoróforos, etc.

40 Por cuestiones de conveniencia, los componentes de ensayo de la presente invención pueden proporcionarse en un kit, una combinación envasada con cantidades predeterminadas de nuevos reactivos empleados para el ensayo de docetaxel. Estos reactivos incluyen el anticuerpo de esta invención, así como los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmula II-A, II-B y II-C o mezclas de los mismos. Generalmente se prefiere que en un inmunoensayo dado, si se utiliza un conjugado formado a partir de un compuesto de fórmula II-B, el anticuerpo se genera por un inmunógeno formado a partir de un compuesto de fórmula II-B. De un modo similar, si se utiliza un conjugado formado a partir de un compuesto de fórmula II-B o II-C, se usa el anticuerpo generado por el inmunógeno formado a partir del mismo compuesto para el conjugado. Sin embargo, no se da el caso de esta necesidad y los anticuerpos y conjugados en un ensayo dado pueden obtenerse de uno cualquiera o de estos conjugados e inmunógenos. En la realización de un inmunoensayo de acuerdo con esta invención, los radicales p, X, Y y B en el reactivo y el inmunógeno que forma el anticuerpo usado en un inmunoensayo dado pueden ser iguales o un sustituyente diferente dentro de los grupos definidos para cada uno de estos radicales. Por lo tanto, aunque las definiciones de los radicales p, X, Y, y B son iguales para el reactivo conjugado y el inmunógeno, el sustituyente particular que estos radicales representan para el inmunógeno y el reactivo conjugado en un ensayo dado puede ser diferente.

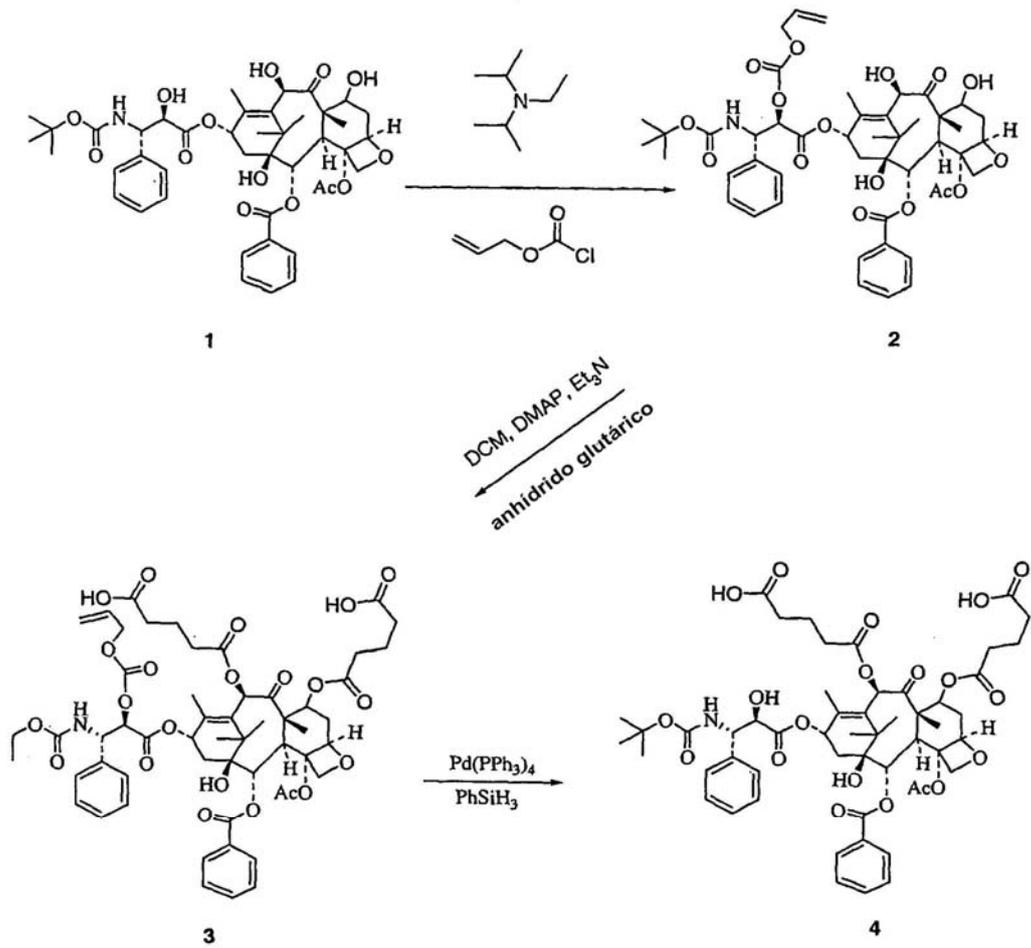
- 5 Además de estos reactivos necesarios, pueden incluirse aditivos tales como reactivos auxiliares, por ejemplo, estabilizadores, tampones y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución e los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse en solución o en forma de un polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tendrá las concentraciones apropiadas para realizar el ensayo.

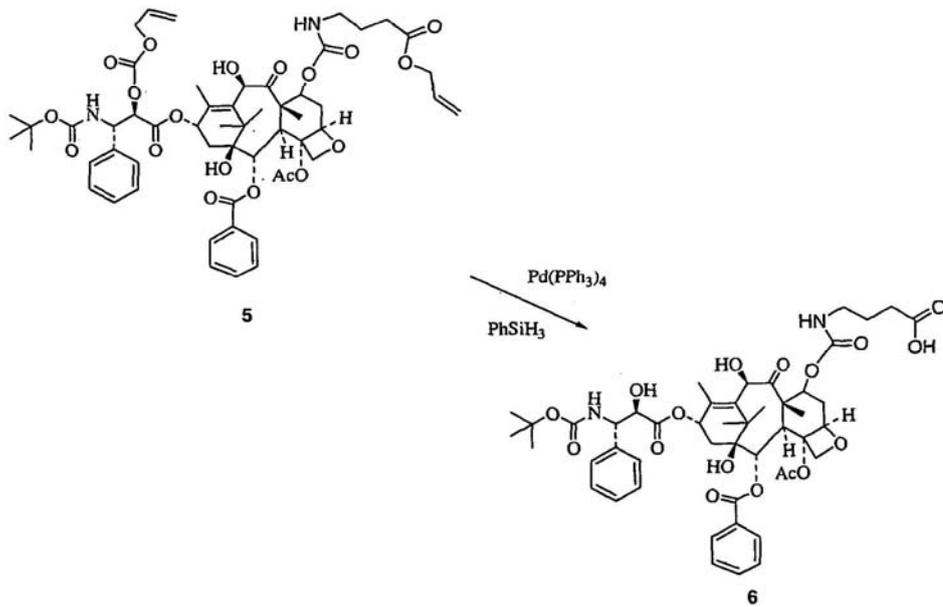
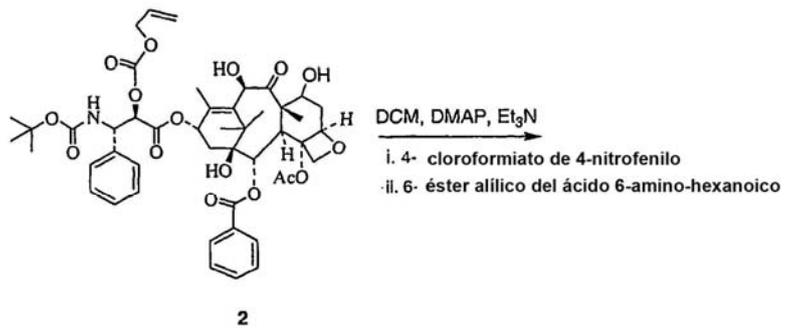
EJEMPLOS

En los Ejemplos, se usan las siguientes abreviaturas para indicar lo siguiente:

	AE	Alcohol etílico
10	MeOH	Metanol
	EtOAc	Acetato de etilo
	DCM	Diclorometano
	DMAP	Dimetilaminopiridina
	Et ₃ N	Trietilamina
15	NHS	N-hidroxi-succinimida
	EDC	Clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
	CCF	Cromatografía en capa fina
	KLH	Hemocianina de lapa californiana
	ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico
20	i.p.	Intraperitoneal
	HRP	Peroxidasa de rábano rusticano
	TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
	TRIS	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
	BSA	Albúmina sérica bovina
25	BTG	Tiroglobulina bovina
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
	HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanosulfónico
	di	Agua desionizada

- 30 En los siguientes Ejemplos, Esquema 1 y Esquema 2 se exponen los compuestos específicos preparados y se denominan por números en los Ejemplos. Estos esquemas son los siguientes:





Ejemplo**Ejemplo 1****Preparación de derivado di-ácido de C7, C10 docetaxel [4] Esquema I**

5 Se añadió docetaxel [1] (500 mg) a un matraz de tres bocas en 20 ml de diclorometano recién destilado, en un flujo continuo de argón. La temperatura se mantuvo a -15°C, momento en el cual se añadieron diisopropiletilamina (2 equiv.) y cloroforniato de alilo (1,1 equiv.). La temperatura de la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 5 horas. Se añadieron 20 ml de diclorometano y la mezcla se lavó con HCl 0,1 N (60 ml), se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró en un rotavapor. El material bruto se purificó sobre una columna de gel de sílice con EtOAc/DCM como gradiente (EtOAc al 30%:DCM al 71%) produciendo [2] (468 mg, 84-78%) en forma de un sólido blanquecino.

10 A una solución del docetaxel aloc-prottegido, [2], (511 mg, 0,57 mmol) y DMAP (0,22 mmol) en DCM (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió Et₃N (0,22 mmol) seguido de la adición de anhídrido glutárico (2 equiv.). La mezcla resultante se dejó en agitación durante una noche a temperatura ambiente. El DCM se retiró al vacío y el material bruto se purificó sobre una columna de gel de sílice con gradiente de EtOAc/DCM (EtOAc al 40%:DCM al 60%) produciendo [3] (194 mg, 30,23%) en forma de un sólido blanquecino.

15 El derivado [3] (0,173 mmol) se disolvió en 6 ml de diclorometano en atmósfera de argón y después se añadió PhSiH₃ (1,04 mmol) junto con Pd (PPh₃)₄ (0,008 mmol). Después de 4 horas, se añadieron 1,5 ml de MeOH y la mezcla se agitó durante 10 minutos adicionales. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad produciendo el derivado de docetaxel desprotegido [4].

20 El derivado [4] se purificó sobre una columna de gel de sílice (EtOAc al 60%:DCM al 40% como sistema disolvente) para separar este derivado de la presencia de los otros derivados tales como el derivado de 7-monodocetaxel y el derivado 10-monodocetaxel. El derivado [4] se aisló en forma de una goma blanquecina (145,1 mg, 80,86%), 24,25% calculado a partir del material de partida y su estructura se confirmó por RMN.

Ejemplo 2**Preparación de derivado di-ácido de C7, C10 docetaxel activado a partir del compuesto [4]**

30 El derivado de ácido diglutárico [4] (125,1 mg, 0,121 mmol) se disolvió en 10 ml de DMSO seco. Con agitación en atmósfera de nitrógeno se añadió sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (114,7 g, 0,528 mmol, 4,4 equiv.) seguido de EDC (102,4 mg, 0,534 mmol, 4,4 equiv.). La reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente cuando se añadió EDC adicional (96 mg, 0,501 mmol, 4,15 equiv.). Después de 7 horas de agitación continuada a temperatura ambiente, la reacción estaba completa por CCF. Las condiciones de CCF fueron acetato de etilo:diclorometano (3:2) con 2 gotas de ácido acético.

Ejemplo 3**Preparación de conjugado de docetaxel-BSA con derivado di-ácido de C7, C10 docetaxel activado (proporción 1:1)**

40 A una solución de 20 ml de BSA (50 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (50 mM, pH 7,5) con agitación en hielo, se añadieron gota a gota 1,34 ml (0,016 mmol) del derivado de docetaxel de éster de N-hidroxisulfosuccinimida activado preparado en el Ejemplo 2. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante una noche a temperatura ambiente produciendo el conjugado di-ácido con BSA. Este conjugado después se purificó por diálisis y se caracterizó de acuerdo con procedimientos descritos previamente (Wu y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 385-390, 1997, Li y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 896-905, 1997, Salamone y col., J. Forensic Sci. pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 4**Preparación de inmunógeno de derivado di-ácido de C7, C10 docetaxel con BTG**

50 A una solución de 6,1 ml de BTG (32,9 mg/ml) en tampón fosfato (50 mM, pH 7,5) con agitación en hielo, se añadieron gota a gota 5,1 ml (0,0617 mmol) del derivado de docetaxel de éster de N-hidroxisulfosuccinimida activado preparado en el Ejemplo 2. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante una noche a temperatura ambiente produciendo el conjugado di-ácido con BTG. El conjugado inmunogénico después se purificó por diálisis y se caracterizó de acuerdo con procedimientos descritos previamente (Wu y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 385-390, 1997, Li y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 896-905, 1997, Salamone y col., J. Forensic Sci. pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 5**Preparación de inmunógeno de derivado di-ácido de C7, C10 docetaxel con KLH**

A una solución de 5,4 ml de KLH (8,9 mg/ml) en tampón fosfato (50 mM, pH 7,5) con agitación en hielo, se añadieron gota a gota 5,1 ml (0,0145 mmol) del derivado de docetaxel de éster de N-hidroxisulfosuccinimida activado preparado en el Ejemplo 2. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante una noche a temperatura ambiente produciendo el conjugado di-ácido con KLH. El conjugado inmunogénico después se purificó por diálisis y se caracterizó de acuerdo con procedimientos descritos previamente (Wu y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 385-390, 1997, Li y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 896-905, 1997, Salamone y col., J. Forensic Sci. pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 6**Preparación de derivado ácido de docetaxel C7 sustituido [6] Esquema II**

A una solución de docetaxel aloc-prottegido, [2], (201 mg, 0,23 mmol) y DMAP (110 mg, 0,9 mmol) en DCM (6 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió Et₃N (0,9 mmol, 0,13 ml) seguido de cloroformiato de p-nitrofenilo (54,6 mg, 0,27 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas y después se añadió una solución de éster alílico del ácido 6-aminohexanoico (52,6 mg, 0,29 mmol) en DCM (2 ml). La mezcla resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El DCM se retiró al vacío y el material bruto se purificó sobre una columna de gel de sílice con EtOAc/hexanos como gradiente (R_f = 0,39, EtOAc al 50%/hexanos) produciendo [5] (81,4 mg, 35%) en forma de una goma blanquecina.

A una solución de [5] (100 mg, 0,094 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (15,3 mg, 0,013 mmol) en DCM (6 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió una solución de PhSiH₃ (40,8 mg, 0,38 mmol) en DCM (1 ml). La mezcla resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El DCM se retiró y el material bruto se purificó sobre una columna de gel de sílice con MeOH/DCM como gradiente (R_f = 0,2, MeOH al 10%/DCM) dando [6] (39,6 mg, 41%) en forma de una goma color bronce y su estructura se confirmó por RMN.

Ejemplo 7**Preparación de derivado ácido de docetaxel C7 sustituido activado a partir del compuesto [6]**

El derivado [6] (39,6 mg, 0,042 mmol) se disolvió en 5 ml de DCM seco. Con agitación en atmósfera de nitrógeno, se añadió NHS (14,5 mg, 0,126 mmol, 3,0 equiv.) seguido de EDC (24,0 mg, 0,126 mmol, 3,0 equiv.). La reacción se agitó durante 29 horas a temperatura ambiente y después se interrumpió por la adición de HCl (3 ml, 0,3 N) y 15 ml de DCM. La mezcla se agitó durante 10 minutos y la fase orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se retiró el DCM al vacío produciendo un sólido amorfo blanquecino.

Ejemplo 8**Preparación de conjugado de docetaxel-BSA con derivado ácido de docetaxel C7 sustituido activado (proporción 1:1)**

El éster activado producido en el Ejemplo 6 se disolvió en 700 µl de DMSO y 50 µl de esta solución se añadió gota a gota a 8 ml de una solución de BSA (4 ml de DMSO/4 ml de fosfato 50 mM, pH 7,5). La solución se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente produciendo el conjugado de BSA y el derivado de docetaxel [6]. Este conjugado se purificó por diálisis de acuerdo con procedimientos descritos previamente (Wu y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 385-390, 1997, Li y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 896-905, 1997, Salamone y col., J. Forensic Sci. pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 9a**Preparación de inmunógeno de derivado ácido de docetaxel C7 sustituido con BTG**

A 6,3 ml de BTG (21,1 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (50 mM, pH 7,5) agitando en hielo, se añadieron lentamente gota a gota 12,6 ml de DMSO. A esta solución, se añadió gota a gota el éster NHS activado del docetaxel C₇ sustituido (derivado [6]) preparado en el Ejemplo 7 (650 µl, 62 mg/ml en DMSO). La mezcla resultante se dejó en agitación durante una noche a temperatura ambiente para conjugar la BTG con el derivado de C₇ docetaxel. Este conjugado inmunogénico después se purificó por diálisis y se caracterizó de acuerdo con procedimientos descritos previamente (Wu y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 385-390, 1997, Li y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 896-905, 1997, Salamone y col., J. Forensic Sci. pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 9b**Preparación de inmunógeno de derivado ácido de docetaxel C7 sustituido con KLH**

A 27,02 ml de KLH (4,92 mg/ml) en DMSO al 66,6%/tampón fosfato 50 mM al 43,4% (50 mM, pH 7,5) se añadió gota a gota el éster NHS activado (del docetaxel C7 sustituido (derivado [6]) preparado en el Ejemplo 7 (1.000 µl, 62 mg/ml en DMSO). La mezcla resultante se dejó en agitación durante una noche a temperatura ambiente para conjugar la KLH con el derivado de C7 docetaxel. Este conjugado inmunogénico después se purificó por diálisis y se caracterizó de acuerdo con procedimientos descritos previamente (Wu y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 385-390, 1997, Li y col., Bioconj. Chem., 8: pág. 896-905, 1997, Salamone y col., J. Forensic Sci. pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 10**Preparación de anticuerpos contra el derivado di-ácido de C7, C10 docetaxel**

Se inmunizaron diez ratones BALB/c hembra i.p. con 100 µg/ratón de docetaxel-inmunógeno: docetaxel-BTG preparado en el Ejemplo 4 o docetaxel-KLH preparado en el Ejemplo 5, emulsionado en adyuvante completo de Freund. Después de la inyección inicial, los ratones se reforzaron cuatro semanas después de la inyección precedente con 100 µg/ratón de los mismos inmunógenos emulsionados en adyuvante incompleto de Freund. De seis a diez días después de los refuerzos, se obtuvieron muestras sanguíneas de ensayo de cada ratón por extracción orbital. El antisuero de las últimas muestras sanguíneas de ensayo que contenían anticuerpos contra docetaxel de cada uno de los ratones se evaluó por los procedimientos de los Ejemplos 14a y 15 para determinar su reactividad al docetaxel y su reactividad cruzada a 10-O-desacetilbaccatina III y paclitaxel [Taxol]. Solamente se seleccionaron los antisueros que tenían anticuerpos que eran selectivos para el docetaxel y tenían una reactividad cruzada con relación al docetaxel con 10-O-desacetilbaccatina III y paclitaxel del 6% o menos determinada por estos procedimientos de exploración.

Ejemplo 11**Preparación de anticuerpos contra el derivado ácido de docetaxel C7 sustituido**

Se inmunizaron diez ratones BALB/c hembra i.p. con 100 µg/ratón de docetaxel-inmunógeno: docetaxel-BTG preparado en el Ejemplo 9a o inmunógeno de docetaxel-KLH preparado en el Ejemplo 9b, emulsionado en adyuvante completo de Freund. Después de la inyección inicial, los ratones se reforzaron una vez después de cuatro semanas con 100 µg/ratón del mismo inmunógeno emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. Diez días después de los refuerzos, se obtuvieron muestras sanguíneas de ensayo de cada ratón por extracción orbital. El antisuero de las últimas muestras sanguíneas de ensayo que contenían anticuerpos contra docetaxel de cada uno de los ratones se evaluó por los procedimientos de los Ejemplos 14a y 16 para determinar su reactividad al docetaxel y su reactividad cruzada a 10-O-desacetilbaccatina III y paclitaxel [Taxol]. Solamente se seleccionaron los antisueros que tenían anticuerpos que eran selectivos para el docetaxel y tenían una reactividad cruzada con relación al docetaxel con 10-O-desacetilbaccatina III y paclitaxel del 6% o menos determinada por estos procedimientos de exploración.

Para los anticuerpos monoclonales empezando cuatro días antes de la fusión, se inyectó a los ratones i.p. con 400 µg (3 días antes de la fusión), 200 µg (2 días antes de la fusión), y 200 µg (1 día antes de la fusión) en tres días sucesivos con docetaxel-BTG o docetaxel-KLH (dependiendo del inmunógeno original) en PBS. De acuerdo con el protocolo de Coligan y col., se aislaron las células esplénicas de los ratones seleccionados y se fusionaron con 2×10^7 células de la línea celular de mieloma (SP2/0) compañera de fusión usando polietilenglicol 1500 al 50% [Coligan, J.E. y col., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.1 - 2.5.8, (1992), Wiley & Sons, NY.]. Para cultivar las células fusionadas en colonias productoras de anticuerpos de acuerdo con el procedimiento de Coligan y col., las células fusionadas se sembraron en 10 placas de 96 pocillos en un medio de crecimiento selectivo convencional HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) tal como DMEM/F12 (medio de Eagle modificado por Dulbecco 1:1 con L-glutamina y HEPES) suplementado con suero bovino fetal al 20% alternativo, y que contiene L-glutamina al 2% (100 mM) y HAT 50X al 2%. Dos semanas después, se ensayó el sobrenadante de hibridoma para la presencia de anticuerpos anti-docetaxel por ELISA como se describe en el Ejemplo 14b. Los pocillos positivos se expandieron y se exploraron de nuevo por el mismo procedimiento ELISA. Los clones positivos se subclonaron directamente o se confirmaron para la unión a docetaxel por un ELISA competitivo como se describe en el Ejemplo 16. Los clones positivos por ELISA como se describe en el Ejemplo 14b, se subclonaron una o dos veces por dilución limitante de acuerdo con el procedimiento descrito en Coligan, J.E. y col., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.8 - 2.5.17, (1992), Wiley & Sons, NY.

Solamente se seleccionaron los anticuerpos monoclonales que eran selectivos para docetaxel y tenían una reactividad cruzada con relación al docetaxel con 10-O-desacetilbaccatina III y paclitaxel del 15% o menos determinada por estos procedimientos de exploración.

Ejemplo 12**Procedimiento de sensibilización en placa de microtitulación con conjugado de derivado di-ácido de C7, C10 docetaxel - BSA**

5 Para el propósito de explorar anticuerpos y medir la concentración de docetaxel por el procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), se usaron placas de microtitulación de poliestireno optimizadas para la unión de proteína y que contienen 96 pocillos por placa. Cada pocillo se revistió con conjugado de docetaxel-BSA (preparado como en el Ejemplo 3) añadiendo 300 μ l de conjugado de docetaxel-BSA a 10 μ g/ml en bicarbonato sódico 0,05 M, pH=9,6, e incubando durante tres horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con bicarbonato sódico 0,05 M, pH 9,6 10 y después se bloquearon con 400 μ l de sacarosa al 5%, solución de caseinato sódico al 0,2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución posterior al revestimiento, las placas se secaron a 37°C durante una noche.

Ejemplo 13**Procedimiento de sensibilización en placa de microtitulación con conjugado de derivado ácido de docetaxel C7 sustituido - BSA**

15 Para el propósito de explorar anticuerpos y medir la concentración de docetaxel por el procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), se usaron placas de microtitulación de poliestireno optimizadas para la unión de proteína y que contienen 96 pocillos por placa. Cada pocillo se revistió con conjugado de docetaxel-BSA (preparado como en el Ejemplo 8) añadiendo 300 μ l de conjugado de docetaxel-BSA a 10 μ g/ml en bicarbonato sódico 0,05 M, pH=9,6, e incubando durante tres horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con bicarbonato sódico 0,05 M, pH 9,6 20 y después se bloquearon con 400 μ l de sacarosa al 5%, solución de caseinato sódico al 0,2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución posterior al revestimiento, las placas se secaron a 37°C durante una noche.

Ejemplo 14^a**Procedimiento de exploración de anticuerpos - título**

Los anticuerpos se exploraron por el procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Este procedimiento para explorar anticuerpos contra docetaxel (producidos en los Ejemplos 10 y 11) se realizó con las placas de microtitulación que se sensibilizaron con docetaxel-BSA como se ha descrito en los Ejemplos 12 y 13. El ensayo de exploración de anticuerpos se realizó diluyendo los antisueros que contienen anticuerpos contra docetaxel a 1:100, 1:1.000, 1:10.000 y 1:100.000 en solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 0,1% y timerosal al 0,01%. A cada pocillo de los pocillos sensibilizados con docetaxel-BSA (preparados en los Ejemplos 12 y 13) se añadieron 100 μ l de anticuerpo diluido y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 35 agitación. Durante esta incubación el anticuerpo se une al docetaxel-conjugado en el pocillo. Los pocillos de las placas se lavaron tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9%, Tween-80 al 0,5% y timerosal al 0,001%, pH 7,8 para retirar cualquier anticuerpo no unido. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra docetaxel unido al conjugado de docetaxel-BSA en los pocillos, se añadieron 100 μ l de un conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido a una actividad específica predeterminada (aproximadamente 1/2400) en PBS con BSA al 0,1%, ANS al 0,05%, timerosal al 0,01%, capaz de unirse específicamente con inmunoglobulinas murinas y que produce un producto coloreado cuando se incuba con un sustrato, a cada pocillo. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP se une a los anticuerpos contra docetaxel en los pocillos, las placas se lavaron de nuevo tres veces para retirar el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado estuvo seguido de la adición de 100 μ l de TMB (sustrato líquido de TMB), un sustrato para HRP, para desarrollar color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Después de la incubación para el desarrollo de color, se añadieron 50 μ l de solución de detención (fluoruro sódico al 1,5% en H₂O di) a cada pocillo para detener el desarrollo de color y después de 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm con un lector de placa de 96 pocillos. La cantidad de anticuerpo en un pocillo era proporcional a la absorbancia medida y se expresó como la dilución (título) resultante a una absorbancia de 1,5. Los títulos se determinaron representando el log de la dilución de anticuerpo del anticuerpo medido (eje x) frente a la absorbancia a 650 nm (eje y) y extrapolando el título a una absorbancia de 1,5. El título determinó la concentración (dilución) de anticuerpo usada en el ensayo de placa de microtitulación competitivo indirecto descrito en los Ejemplos 15 y 16. 50 55

Ejemplo 14b**Procedimiento de exploración de anticuerpos - exploración monoclonal**

Los anticuerpos se exploraron por el procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Este procedimiento para explorar anticuerpos monoclonales contra docetaxel (producidos en el Ejemplo 11) se realizó con las placas de microtitulación que se sensibilizaron con docetaxel C7 sustituido-BSA (Ejemplo 8) como se ha descrito en el Ejemplo 13. A cada pocillo de los pocillos sensibilizados con docetaxel C7 sustituido-BSA (preparados en el Ejemplo 13) se añadieron 50 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 0,1% y timerosal al 0,01% y después 50 µl de sobrenadante de cultivo monoclonal y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Durante esta incubación el anticuerpo se une al docetaxel C7 sustituido-conjugado en el pocillo. Los pocillos de las placas se lavaron tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9%, Tween-80 al 0,5% y timerosal al 0,001%, pH 7,8 para retirar cualquier anticuerpo no unido. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra docetaxel unido al conjugado de docetaxel C7 sustituido-BSA en los pocillos, se añadieron 100 µl de un conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido a una actividad específica predeterminada (aproximadamente 1/2400) en PBS con BSA al 0,1%, ANS al 0,05%, timerosal al 0,01%, capaz de unirse específicamente con inmunoglobulinas murinas y que produce un producto coloreado cuando se incuba con un sustrato, a cada pocillo. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP se une a los anticuerpos contra doxorubicina en los pocillos, las placas se lavaron de nuevo tres veces para retirar el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado estuvo seguido de la adición de 100 µl de TMB (sustrato líquido de TMB), un sustrato para HRP, para desarrollar color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Después de la incubación para el desarrollo de color, se añadieron 50 µl de solución de detención (fluoruro sódico al 1,5% en H₂O di) a cada pocillo para detener el desarrollo de color y después de 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm con un lector de placa de 96 pocillos. La cantidad de anticuerpo en un pocillo era proporcional a la absorbancia medida. Las muestras con una absorbancia tres veces la de fondo o mayor se consideraron positivas.

Ejemplo 15**Procedimiento de inmunoensayo en placa de microtitulación competitivo indirecto que determina la CI_{50} y la reactividad cruzada para anticuerpos contra el conjugado del derivado di-ácido de C7, C10 docetaxel**

Las concentraciones de docetaxel se midieron por un procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) competitivo indirecto. Este procedimiento para medir las concentraciones de docetaxel se realizó con las placas de microtitulación que se sensibilizaron con el docetaxel-BSA descrito en el Ejemplo 13. Se diluyeron docetaxel, paclitaxel, y 10-O-desacetilbaccatina III 10 veces en PBS con BSA al 0,1% y timerosal al 0,01% sobre un intervalo de concentración de 0,01 a 10.000 ng/ml. El ensayo se realizó incubando 50 µl de los analitos a medir con 50 µl de anticuerpo (producido en el Ejemplo 10 con el inmunógeno del Ejemplo 5) diluido a un título determinado en el Ejemplo 14a. Durante la incubación de 10 minutos (T.A., con agitación) hay una competición por la unión del anticuerpo con el conjugado de docetaxel en el pocillo y el analito en solución. Después de esta incubación, los pocillos de la placa se lavaron tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9%, Tween-80 al 0,5% y timerosal al 0,001%, pH 7,8 para retirar cualquier material que no estuviera unido. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra docetaxel unido al conjugado de docetaxel-BSA en los pocillos, se añadieron 100 µl de un conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido a una actividad específica predeterminada (aproximadamente 1/2400) en PBS con BSA al 0,1%, ANS al 0,05%, timerosal al 0,01%, capaz de unirse específicamente con inmunoglobulinas murinas y que produce un producto coloreado cuando se incuba con un sustrato, a cada pocillo. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP se une a los anticuerpos contra docetaxel en los pocillos, las placas se lavaron de nuevo tres veces para retirar el conjugado secundario no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado estuvo seguido de la adición de 100 µl de TMB (sustrato líquido de TMB), un sustrato para HRP, para desarrollar color en una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Después de la incubación para el desarrollo de color, se añadieron 50 µl de solución de detención (fluoruro sódico al 1,5% en H₂O di) a cada pocillo para detener el desarrollo de color y después de 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm con un lector de placa de 96 pocillos. La cantidad de anticuerpo en un pocillo era proporcional a la absorbancia medida e inversamente proporcional a la cantidad de docetaxel en la muestra. La absorbancia del color en los pocillos que contenían analito se comparó con la de los pocillos sin analito y se generó una curva patrón. El valor de CI_{50} para un analito dado se definió como la concentración de analito que es necesaria para inhibir el 50% de la absorbancia de los pocillos que no contienen analito. La reactividad cruzada de un analito dado se calculó como la proporción de la CI_{50} para el docetaxel a la CI_{50} para el paclitaxel y 10-O-desacetilbaccatina III expresada como un porcentaje. Cuando se midió con un

anticuerpo producido en el Ejemplo 10 con inmunógeno del Ejemplo 4 y 5, se obtuvieron anticuerpos con porcentajes de reactividad cruzada con relación al docetaxel para paclitaxel y 10-O-desacetilbaccatina III $\leq 6\%$.

Ejemplo 16

5 Procedimiento de inmunoensayo en placa de microtitulación competitivo indirecto que determina la CI_{50} y la reactividad cruzada para anticuerpos contra el conjugado del derivado ácido de docetaxel C7 sustituido

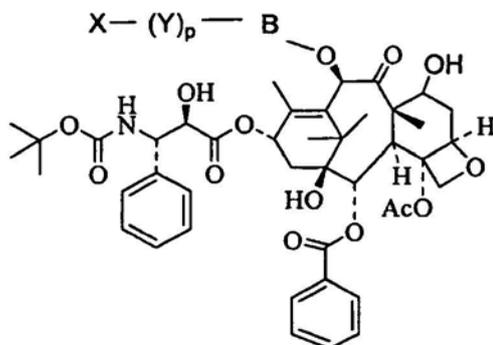
10 Las concentraciones de docetaxel se midieron por un procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) competitivo indirecto. Este procedimiento para medir las concentraciones de docetaxel se realizó con las placas de microtitulación que se sensibilizaron con el docetaxel-BSA descrito en el Ejemplo 13 para anticuerpos monoclonales y en los Ejemplos 12 y 13 para anticuerpos policlonales. Se diluyeron docetaxel, paclitaxel, y 10-O-desacetilbaccatina III 10 veces en PBS con BSA al 0,1% y timerosal al 0,01% sobre un intervalo de concentración de 0,01 a 10.000 ng/ml. El ensayo se realizó incubando 50 μ l de los analitos a medir con 50 μ l de anticuerpo (producido en el Ejemplo 11) diluido a un título determinado en el Ejemplo 14a. Durante la incubación de 10 minutos (T.A., con agitación) hay una competición por la unión del anticuerpo con el conjugado de docetaxel en el pocillo y el analito en solución. Después de esta incubación, los pocillos de la placa se lavaron tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9%, Tween-80 al 0,5% y timerosal al 0,001%, pH 7,8 para retirar cualquier material que no estuviera unido. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra docetaxel unido al conjugado de docetaxel-BSA en los pocillos, se añadieron 100 μ l de un conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido a una actividad específica predeterminada (aproximadamente 1/2400) en PBS con BSA al 0,1%, ANS al 0,05%, timerosal al 0,01%, capaz de unirse específicamente con inmunoglobulinas murinas y que produce un producto coloreado cuando se incubaba con un sustrato, a cada pocillo. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón - enzima HRP se une a los anticuerpos contra docetaxel en los pocillos, las placas se lavaron de nuevo tres veces para retirar el conjugado secundario no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado estuvo seguido de la adición de 100 μ l de TMB (sustrato líquido de TMB), un sustrato para HRP, para desarrollar color en una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Después de la incubación para el desarrollo de color, se añadieron 50 μ l de solución de detención (fluoruro sódico al 1,5% en H₂O di) a cada pocillo para detener el desarrollo de color y después de 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm con un lector de placa de 96 pocillos. La cantidad de anticuerpo en un pocillo era proporcional a la absorbancia medida e inversamente proporcional a la cantidad de docetaxel en la muestra. La absorbancia del color en los pocillos que contenían analito se comparó con la de los pocillos sin analito y se generó una curva patrón. El valor de CI_{50} para un analito dado se definió como la concentración de analito que es necesaria para inhibir el 50% de la absorbancia de los pocillos que no contienen analito. La reactividad cruzada de un analito dado se calculó como la proporción de la CI_{50} para el docetaxel a la CI_{50} para el paclitaxel y 10-O-desacetilbaccatina III expresada como un porcentaje. Cuando se midió con un anticuerpo producido en el Ejemplo 11 con inmunógeno del Ejemplo 9a, en una placa de microtitulación preparada como en el Ejemplo 12, el porcentaje de reactividad cruzada con relación al docetaxel para paclitaxel fue menor del 2%, y para 10-O-desacetilbaccatina III menor del 0,02%.

45 Cuando se midió con un anticuerpo producido en el Ejemplo 11 con inmunógeno del Ejemplo 9a, en una placa de microtitulación preparada como en el Ejemplo 13, se obtuvieron porcentajes de reactividad cruzada con relación al docetaxel para paclitaxel menores del 1%, y para 10-O-desacetilbaccatina III menores del 0,01%. Cuando se midió con un anticuerpo monoclonal producido en el Ejemplo 11 con inmunógeno de los Ejemplos 9a y 9b, en una placa de microtitulación preparada como en el Ejemplo 13, el porcentaje de reactividad cruzada con relación al docetaxel para paclitaxel fue menor del 12%, y para 10-O-desacetilbaccatina III menor del 1,0%.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo para detectar el docetaxel en una muestra, que comprende proporcionar una mezcla que contiene una muestra, un anticuerpo que reacciona con el docetaxel y tiene una reactividad cruzada con relación al docetaxel con taxol del 20% o menos, y un conjugado de un vehículo con un ligando seleccionado entre un compuesto de fórmula:

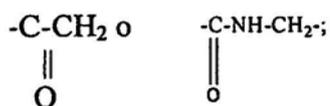
5



II-A

en la que B es $-\text{CH}_2-$;

10

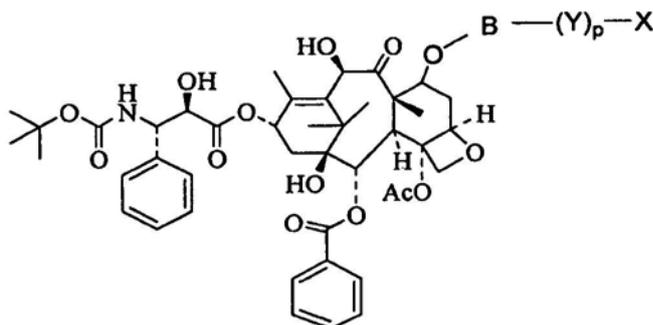


Y es un grupo espaciador orgánico;

15 X es un grupo funcional capaz de unirse a un vehículo; y

p es un número entero de 0 a 1;

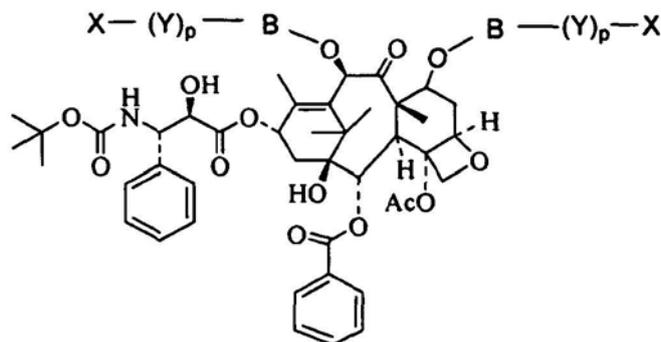
un compuesto de fórmula:



II-B

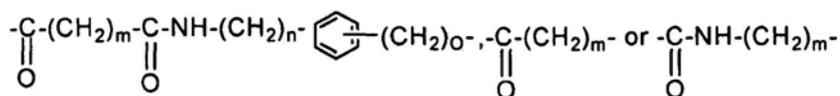
en la que B, X, Y y p son como anteriormente;

20 un compuesto de fórmula

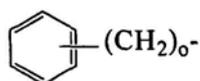


II-C

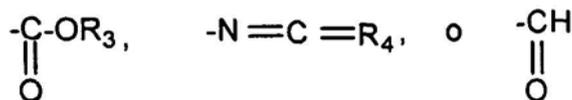
- 5 en la que B, X, Y y p son como anteriormente,
 y mezclas de los mismos, causar que el docetaxel en la muestra y dicho conjugado se unan con dicho anticuerpo y después de ello medir la cantidad de dicho conjugado en dicha mezcla que está unido o no unido con dicho anticuerpo, mediante lo cual se puede determinar la presencia de docetaxel en la muestra.
- 10 2. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que p es 0, en el compuesto de fórmula II-A, II-B y/o II-C.
3. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que p es 1, en el compuesto de fórmula II-A, II-B y/o II-C.
- 15 4. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que Y es alqueno que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,



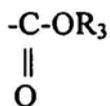
o



- 20 en el que n y o son número enteros de 0 a 6, y m es un número entero de 1 a 6, en el compuesto de fórmula II-A, II-B y/o II-C.
5. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que X es

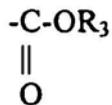


- 25 en el que R₃ es hidrogeno o tomado junto con su átomo de oxígeno unido forma un éster reactivo y R₄ es oxígeno o azufre, en el compuesto de fórmula II-A, II-B y/o II-C.
6. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que X es



y R₃ es hidrógeno, en el compuesto de fórmula II-A, II-B y/o II-C.

7. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que X es

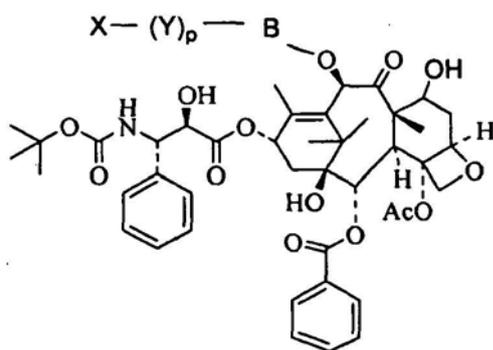


5 y R₃ forma un éster reactivo, en el compuesto de fórmula II-A, II-B y/o II-C.

8. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el éster formado es un éster de alquilo inferior, imidoéster o amidoéster, en el compuesto de fórmula II-A, II-B y/o II-C.

9. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es una muestra humana.

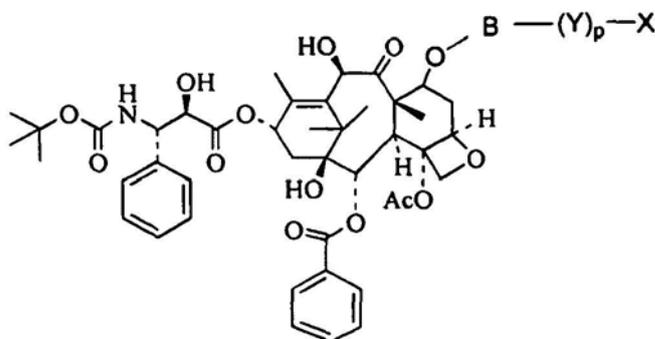
10. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que dicho anticuerpo se genera a partir de un inmunógeno que comprende un vehículo inmunogénico unido a un ligando seleccionado entre el grupo constituido por un compuesto de fórmula:



II-A

15 en la que p, Y y B son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y X es un grupo funcional capaz de unirse a un vehículo;

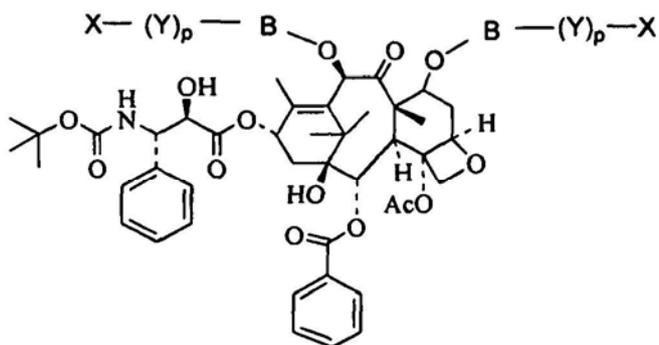
un compuesto de fórmula:



II-B

20 en la que B, X, Y y p son como anteriormente;

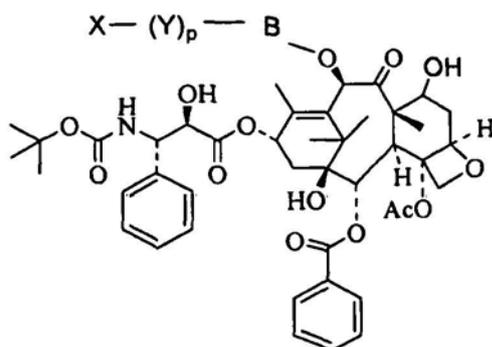
un compuesto de fórmula



II-C

5 en la que B, X, Y y p son como anteriormente,
y mezclas de los mismos.

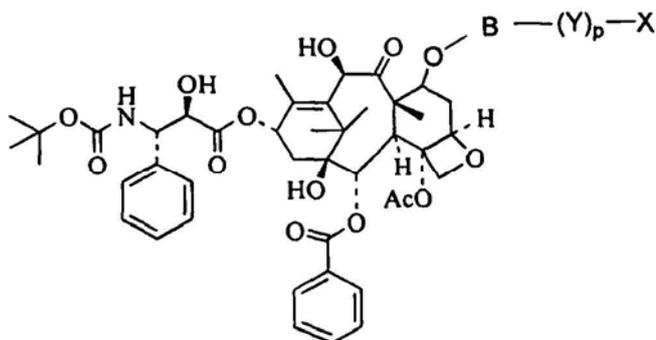
11. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo se obtiene de un inmunógeno de un vehículo inmunogénico con un ligando de fórmula:



II-A

10 en la que B, X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

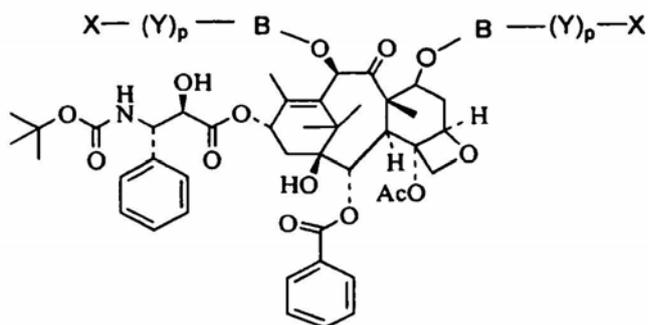
12. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo se obtiene de un inmunógeno de un vehículo inmunogénico con un ligando de fórmula:



II-B

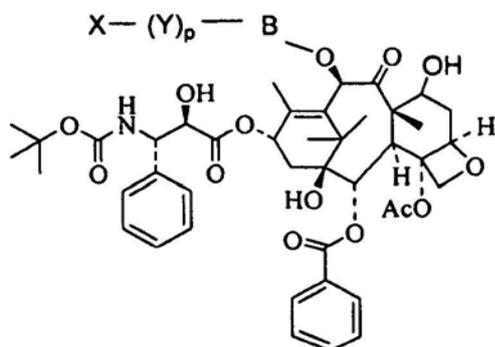
15 en la que B, X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

13. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo se obtiene de un inmunógeno de un polímero de poliamina inmunogénico y un ligando de fórmula:



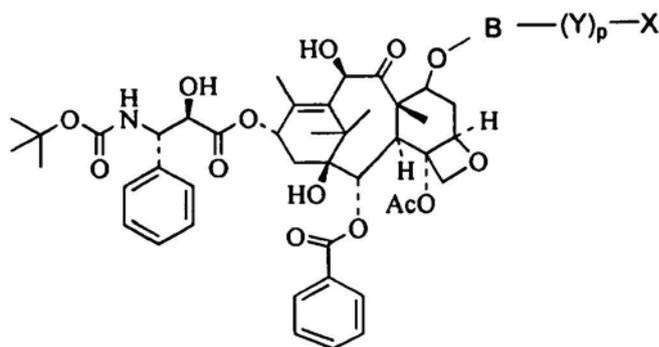
II-C

- 5 en la que B, X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
14. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo está unido a un soporte sólido.
15. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el soporte sólido es placas de microtitulación.
- 10 16. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el soporte sólido es nanopartículas.
17. Un anticuerpo que reacciona con docetaxel y tiene una reactividad cruzada con relación al docetaxel con taxol del 20% o menor.
- 15 18. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho anticuerpo se genera a partir de un inmunógeno que comprende un vehículo inmunogénico unido a un ligando seleccionado entre el grupo que consiste en un compuesto de fórmula:



II-A

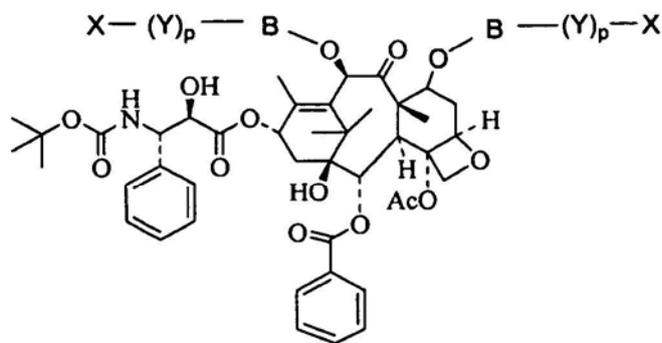
- 20 en la que B, X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un compuesto de fórmula:



II-B

en la que B, X, Y y p son como anteriormente;

un compuesto de fórmula

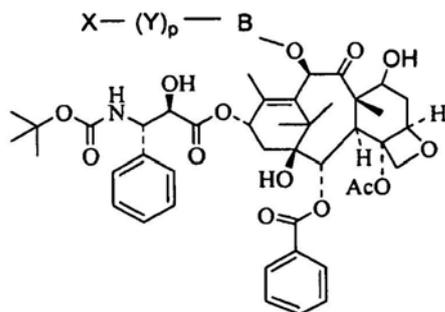


II-C

5 en la que B, X, Y y p son como anteriormente;

y mezclas de los mismos.

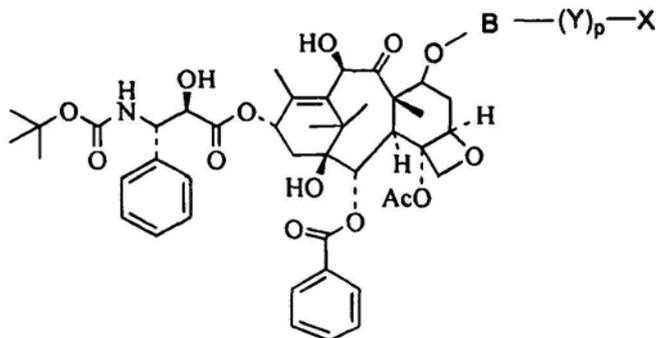
19. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho anticuerpo se obtiene de un inmunógeno de un vehículo inmunogénico con un ligando de fórmula:



II-A

10 en la que X, Y, B y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

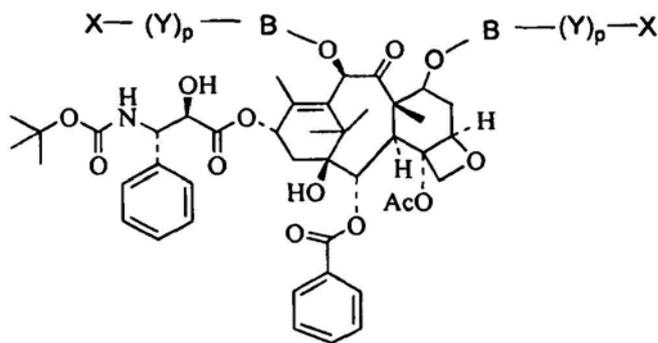
20. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho anticuerpo se obtiene de un inmunógeno de un polímero de poliamina con un ligando de fórmula:



II-B

15 en la que B, X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

21. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho anticuerpo se obtiene de un inmunógeno de un vehículo con un ligando de fórmula:



II-C

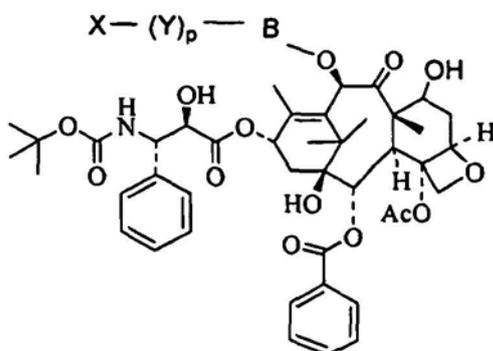
5 en la que B, X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

22. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que dicho anticuerpo se obtiene de ratones, conejos o ratas.

10 23. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y 22 o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo monoclonal.

24. Un kit para determinar la presencia de docetaxel en la muestra de un paciente, que comprende reactivos envasados en recipientes diferentes, siendo uno de los reactivos un anticuerpo que reacciona con el docetaxel y tiene una reactividad cruzada con relación al docetaxel con taxol del 20% o menor, y siendo el otro reactivo un conjugado del vehículo con un ligando seleccionado entre un compuesto de fórmula:

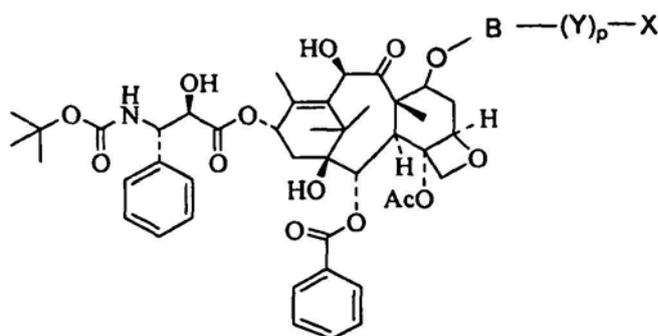
15



II-A

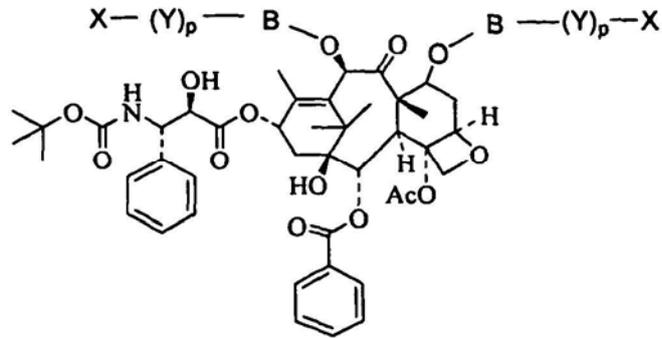
20 en la que B, X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

un compuesto de fórmula:



II-B

en la que B, X, Y y p son como anteriormente;
 un compuesto de fórmula



II-C

5 en la que B, X, Y y p son como anteriormente;
 y mezclas de los mismos.