



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 530**

51 Int. Cl.:

G01N 33/532 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 1/13 (2006.01)

C07D 267/00 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06758774 .1**

96 Fecha de presentación : **27.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1880215**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

54

Título: **Composiciones y métodos para la detección de sirolimus.**

30

Prioridad: **27.04.2005 US 116928**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2011

73

Titular/es:
SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS Inc.
1717 Deerfield Road
Deerfield, Illinois 60015, US

72

Inventor/es: **Worley, Cathy, K.;**
Yang, Yali;
Zheng, Yi-Feng;
Liu, Hshiou-Ting;
Keim, Holger y
Chen, Jian

74

Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 358 530 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

Composiciones y métodos para la detección de sirolimus.

ANTECEDENTES

5 La invención se refiere a compuestos, métodos y kits para la determinación de compuestos de sirolimus tales como, por ejemplo, rapamicina o derivados de la misma, en muestras, tales como muestras de pacientes, que se sabe o se sospecha que contienen tales compuestos de sirolimus.

10 El cuerpo se basa en un complejo sistema de respuestas inmunitarias para distinguir lo propio de lo ajeno. A veces, el sistema inmunitario del cuerpo debe controlarse con el fin de o bien aumentar una respuesta deficiente o bien suprimir una respuesta excesiva. Por ejemplo, cuando se trasplantan órganos tales como el riñón, corazón, corazón-pulmón, médula ósea e hígado en seres humanos, a menudo el cuerpo rechazará el tejido trasplantado mediante un proceso denominado rechazo de aloinjerto.

15 En el tratamiento del rechazo de aloinjerto, el sistema inmunitario se suprime frecuentemente de manera controlada con terapia farmacológica. Los fármacos inmunosupresores se administran con cuidado a los receptores de trasplantes con el fin de ayudar a prevenir el rechazo de aloinjerto de tejido ajeno. Los dos fármacos inmunosupresores administrados más frecuentemente para prevenir el rechazo de órganos en pacientes con trasplantes son ciclosporina (CSA) y FK-506 (FK). Otro fármaco que encuentra uso como inmunosupresor en los Estados Unidos y otros países es el sirolimus, también conocido como rapamicina. También se dice que los derivados de sirolimus son útiles como inmunosupresores. Tales derivados incluyen, por ejemplo, everolimus, y similares.

20 La rapamicina es un antibiótico de triona macrocíclico producido por *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina está relacionada estructuralmente con el inmunosupresor FK-506 (tacrolimus) pero es diferente desde un punto de vista mecanístico. La rapamicina tiene actividad anti-Cándida, antiproliferativa y antitumoral. La rapamicina también disminuye las reacciones autoinmunitarias (LES, artritis adyuvante, encefalomiелitis alérgica). La rapamicina es un potente inmunosupresor que inhibe la activación de células T y B mediante el bloqueo de acontecimientos mediados por citocinas, e inhibe la proliferación celular mediada por el factor de crecimiento.

25 Los efectos secundarios asociados con la rapamicina pueden controlarse en parte controlando cuidadosamente el nivel del fármaco presente en un paciente. Debido a que la distribución y el metabolismo de la rapamicina pueden variar enormemente entre pacientes y debido a la amplia gama y a la gravedad de las reacciones adversas, es esencial una monitorización precisa del nivel de fármaco.

30 Se han preparado varios derivados de rapamicina con la esperanza de encontrar un agente que tenga todas las propiedades inmunosupresoras deseadas de la rapamicina, pero cuyo uso dé como resultado menos efectos secundarios. Tales derivados incluyen la preparación de derivados de rapamicina-oxima (patentes estadounidenses n.ºs 5.672.605; 5.373.014; 5.023.264 y 5.378.836).

35 El documento US-A-2002/002273 se refiere a derivados 40-O-alquilados de rapamicina. El documento WO98/45333 A se refiere a la unión de divinilsulfona a rapamicina en la posición 42. El documento WO94/25022 A se refiere a conjugados de rapamicina en los que la unión es al O en la posición 42. El documento WO94/24304 A también se refiere a derivados 40-O-alquilados de rapamicina. El documento WO93/25533 A (página 5) da a conocer la conjugación en la posición 27 (32 según la numeración en el presente documento) de la rapamicina. El documento EP A 0 467 606 se refiere a la conjugación de la rapamicina también en la posición 27 de la rapamicina. 40 Asimismo, el documento US-A-5.023.264 da a conocer conjugados de rapamicina en la posición 27. El documento US-B-6.328.970 se refiere a conjugados de rapamicina conjugados a través del O en las posiciones 42 ó 31.

45 La rapamicina y sus derivados se están evaluando en varios ensayos clínicos en todo el mundo como agentes inmunosupresores. En los ensayos, se recomienda la monitorización terapéutica de fármacos (TDM, *therapeutic drug monitoring*) de los niveles plasmáticos de rapamicina para todos los pacientes, y especialmente en pacientes pediátricos y en aquellos con insuficiencia hepática. La TDM también se recomienda cuando se coadministran potentes inductores o inhibidores de la enzima CYP3A4. Además, si se administra de manera concomitante rapamicina o su derivado con ciclosporina, se recomienda la TDM porque se altera la farmacocinética durante la coadministración de fármacos. Por ejemplo, si se administra rapamicina de manera concomitante con ciclosporina en vez de administrarse con cuatro horas de separación, aumentan los niveles valle de rapamicina. Por 50 este motivo, así como para limitar determinados efectos secundarios, la TDM debe permitir mejores resultados clínicos en casos seleccionados.

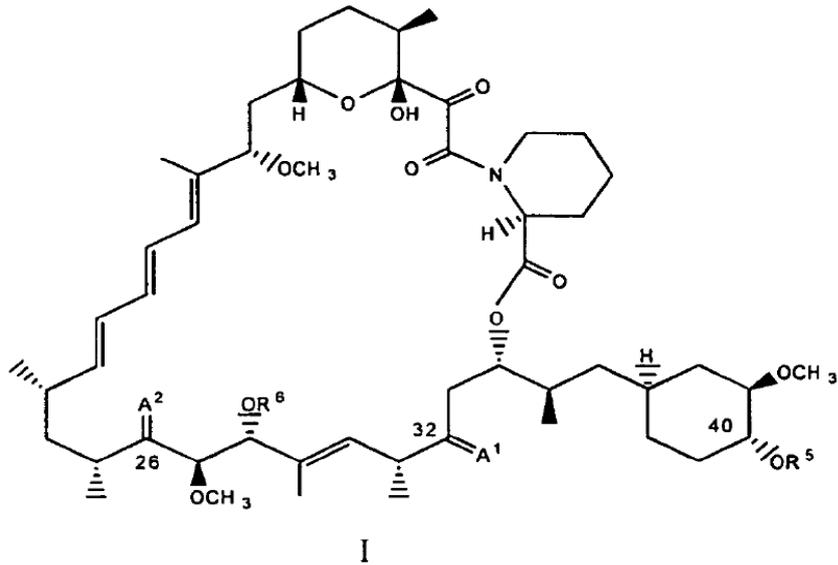
55 Se requiere la monitorización terapéutica de concentraciones de rapamicina y fármacos relacionados en sangre para optimizar los regímenes de dosificación para garantizar una inmunosupresión máxima con una toxicidad mínima. Aunque la rapamicina es un agente inmunosupresor sumamente eficaz, su uso debe manejarse cuidadosamente debido a que el intervalo de dosis eficaz es estrecho y una dosificación excesiva puede dar como resultado graves efectos secundarios. Por otra parte, una dosificación demasiado pequeña de rapamicina puede conducir a rechazo de tejidos.

Existe, por tanto, una necesidad continuada de desarrollar métodos de diagnóstico rápido y preciso para medir los niveles de compuestos de sirolimus tales como rapamicina o un derivado del mismo en pacientes.

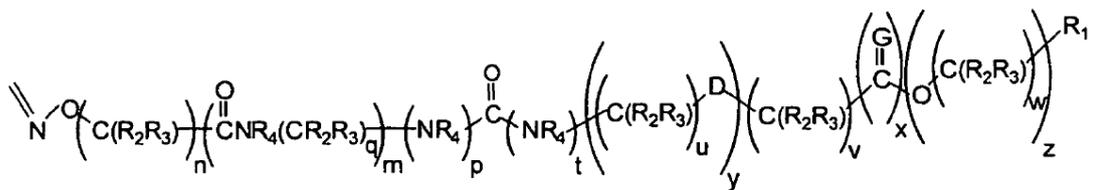
SUMARIO

5 Una realización de la presente invención es un compuesto que comprende un resto, seleccionado del grupo que consiste en un poli(aminoácido) (incluyendo restos de marcador de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos de poli(aminoácido)), o resto de marcador que no es de poli(aminoácido), o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido), unido a un compuesto de sirolimus en la posición 26.

Otra realización de la presente invención es un compuesto de estructura I:



10 en la que A¹ es oxo y A² es un grupo de fórmula:



en la que:

n, q, u, v y w son independientemente de 0 a aproximadamente 12,

m es 0 ó 1,

15 p es 0 ó 1,

t es 0 ó 1,

y es de 0 a 5,

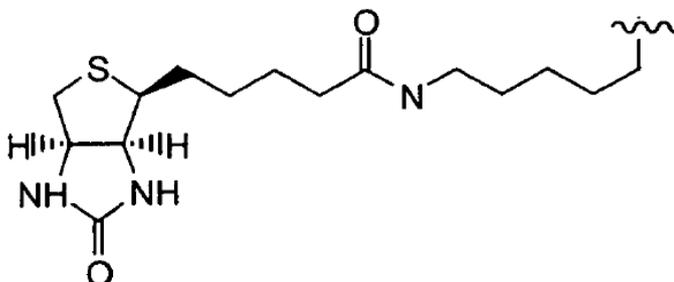
x es 0 ó 1,

z es 0 ó 1,

20 D es O o S,

G es O o NR²,

R¹ es un resto, seleccionado del grupo que consiste en grupos funcionales, restos de marcador de poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de poli(aminoácido), restos de marcador que no son de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido), o



II

5 R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, bencilo, OH, halógeno, alcoxilo C₁₋₆; alquenilo C₃₋₁₀ y alquinilo C₃₋₁₀,

R⁴ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, bencilo, alquenilo C₃₋₁₀, alquinilo C₃₋₁₀; y

10 R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno; fenilo; fenilo sustituido en el que los sustituyentes son X, Y y Z; 1- o 2-naftilo; 1- o 2- naftilo sustituido en el que los sustituyentes son X, Y y Z; C(O)alquilo C₁₋₆; alquilo C₁₋₁₀; cicloalquilo C_{3-C10}; alquilo C₁₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆; fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆; alquenilo C₃₋₁₀; cicloalquenilo C₄₋₁₀; alquenilo C₃₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆, fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆; alquinilo C₃₋₁₀; y alquinilo C₃₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆, fenilo, fenilo sustituido, en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆;

20 X, Y y Z se seleccionan independientemente de: hidrógeno; alquilo C₁₋₇; alquenilo C₂₋₆; halógeno; CN; C(O)H; grupos perhalosustituidos tales como CF₃; SR⁷, en el que R⁷ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, CF₃ o fenilo; SOR⁷, en el que R⁷ es tal como se definió anteriormente; SO₂R⁷, en el que R⁷ es tal como se definió anteriormente; CONR⁵R⁶, en el que R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente; -(CH₂)_mOR⁸, en el que R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃; hidroxi-alquilo C₂₋₃, y m es 0-2, y m es 0-2; alquilo C₁₋₃; hidroxi-alquilo C₂₋₃; CH(OR⁹)(OR¹⁰), en el que R⁹ y R¹⁰ son alquilo C₁₋₃ o tomados juntos forman un puente de etilo o propilo; -(CH₂)_mOC(O)R⁸, en el que R⁸ y m son tal como se definieron anteriormente, y -(CH₂)_mC(O)OR⁸, en el que R⁸ y m son tal como se definieron anteriormente.

25 Otra realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo producido contra un compuesto anterior, en el que el resto es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) unido en la posición 26.

Otra realización de la presente invención es un kit que comprende un anticuerpo para un compuesto de sirolimus tal como, por ejemplo, rapamicina, y un compuesto tal como se mencionó anteriormente en el que el resto es un marcador de poli(aminoácido) o un marcador que no es de poli(aminoácido).

30 Otra realización de la presente invención es un método para la detección de compuestos de sirolimus en una muestra de la que se sospecha que contiene uno o más de tales compuestos. El método comprende combinar una muestra con uno o más compuestos según realizaciones de la presente invención o con componentes de un kit tal como se mencionó anteriormente y examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el compuesto de sirolimus y el anticuerpo para sirolimus, indicando la presencia del mismo la presencia del compuesto de sirolimus en la muestra.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un esquema que representa la síntesis de derivados de oxima de compuestos de sirolimus en las posiciones 26 y 32, respectivamente.

40 La figura 2 es un esquema que representa la síntesis de derivados de proteína de compuestos de sirolimus en la posición 26 cuando las proteínas son KLH y BSA, respectivamente.

La figura 3 es un esquema que representa la síntesis de un grupo conector usado en el esquema representado en la figura 4 para unirlo a la funcionalidad oxima.

La figura 4 es un esquema que representa la síntesis de derivados de oxima de compuestos de sirolimus en las posiciones 26 y 32, respectivamente, usando el grupo conector de la figura 3.

5 La figura 5 es un esquema que representa otra síntesis de derivados de proteína de compuestos de sirolimus en la posición 26 cuando las proteínas son KLH y BSA, respectivamente.

La figura 6 es un esquema que representa la síntesis de derivados con partículas de cromo de compuestos de sirolimus en las posiciones 26 y 32, respectivamente.

10 La figura 7 es un esquema que representa otra síntesis de derivados de oxima de compuestos de sirolimus en las posiciones 26 y 32, respectivamente.

La figura 8 es un esquema que representa la síntesis de derivados con partículas de cromo de compuestos de sirolimus en las posiciones 26 y 32, respectivamente.

La figura 9 es un esquema que representa la síntesis de derivados con partículas de cromo de compuestos de sirolimus en las posiciones 26 y 32, respectivamente.

15 La figura 10 es un esquema que representa la síntesis de un conjugado de G6PDH de sirolimus.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS

20 Tal como se mencionó anteriormente, una realización de la presente invención es un compuesto que comprende un resto, tal como un poli(aminoácido), un resto de marcador que no es de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido), unido a un compuesto de sirolimus en la posición 26. Estas y otras realizaciones se tratan con más detalle a continuación. La presente invención permite el examen eficaz de muestras para determinar la presencia de un compuesto de sirolimus.

25 La expresión "compuesto de sirolimus" tal como se usa en el presente documento incluye rapamicina y sus derivados, otros miembros de la familia del sirolimus y sus derivados, incluyendo, por ejemplo, ésteres, amidas, haloacetamidas, imidas, y similares en una o más posiciones. Los derivados de rapamicina incluyen compuestos que contienen un núcleo de rapamicina, metabolitos de rapamicina y compuestos de rapamicina con apertura de anillo. En algunos enfoques, los derivados de rapamicina se preparan a través de esterificación de uno o más grupos hidroxilo para dar un éster carboxílico, un carbamato, un éster sulfonato, una amida, o similar. Los derivados de rapamicina también incluyen compuestos que resultan de la reducción de uno o más carbonos de carbonilo en un grupo hidroxilo o la reducción de uno o más de los dobles enlaces.

30 En algunas realizaciones, se sintetizan inmunógenos que comprenden portadores inmunogénicos, que incluyen portadores inmunogénicos de poli(aminoácido) y que no son de poli(aminoácido), unidos a un compuesto de sirolimus tal como, por ejemplo, rapamicina, y se usan para preparar anticuerpos específicos para un compuesto de sirolimus tal como, por ejemplo, rapamicina. Los anticuerpos pueden usarse en métodos para detectar los compuestos de sirolimus en muestras de las que se sospecha que contienen los fármacos. En algunas realizaciones, se preparan conjugados de marcador, que incluyen conjugados de marcador de poli(aminoácido) y que no es de poli(aminoácido), y pueden emplearse en los métodos anteriores.

35 En algunas realizaciones, el resto puede estar unido al compuesto de sirolimus tal como, por ejemplo, rapamicina, en la posición 26 por medio de un enlace o un grupo conector. El grupo conector puede comprender de 2 a 50 átomos, o de 4 a 30 átomos, sin contar el hidrógeno y puede comprender una cadena de desde 2 hasta 30 átomos, o de 3 a 20 átomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que normalmente consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. Parte o todo el grupo conector puede ser una parte de la molécula que está unida al compuesto de sirolimus tal como, por ejemplo, un residuo de aminoácido en un poli(aminoácido) y similares. En algunas realizaciones, el grupo conector comprende una funcionalidad oxima.

40 El número de heteroátomos en los grupos conectores oscilará normalmente desde 0 hasta 20, de 1 a 15, o de 2 a 10. Los grupos conectores pueden ser alifáticos o aromáticos. Cuando están presentes heteroátomos, el oxígeno está presente normalmente como oxo u oxilo, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno está presente normalmente como nitro, nitroso o amino, normalmente unido a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre es análogo al oxígeno; mientras que el fósforo se une a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, habitualmente como fosfonato y mono- o diéster de fosfato. Funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre el grupo conector y la molécula que va a conjugarse son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato, y ésteres de fosfato, amidas y tioésteres. Una realización específica de un grupo conector que comprende heteroátomos es una funcionalidad oxima tal como se mencionó anteriormente.

En su mayor parte, cuando un grupo conector tiene una funcionalidad de unión (funcionalidad para la reacción con un resto) tal como, por ejemplo, un grupo que no es oxicarbonilo incluyendo los análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, agente alquilante tal como halo o tosilaquilo, oxilo (hidroxilo o el análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona), u olefina activa tal como una vinilsulfona o éster

5 □-, □-insaturado, estas funcionalidades se unen a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agente alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando se unen una amina y ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se forman amidas, amidinas y fosforamidas. Cuando se unen mercaptano y olefina activada, se forman tioéteres. Cuando se unen un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. Cuando se unen aldehído y una amina en condiciones reductoras, se forma una alquilamina. Cuando se unen una cetona o un

10 aldehído y una hidroxilamina (incluyendo derivados de la misma en los que un sustituyente está en lugar del hidrógeno del grupo hidroxilo), se forma una funcionalidad oxima (=N-O-). Cuando se unen un ácido carboxílico o ácido de fosfato y un alcohol, se forman ésteres. Se conocen bien en la técnica diversos grupos conectores; véase, por ejemplo, Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245:3059.

Tal como se mencionó anteriormente, uno de los restos que puede unirse es un poli(aminoácido), incluyendo, entre otros, proteínas inmunogénicas, proteínas marcadoras, anticuerpos, etcétera. Diversos tipos de proteína está incluidos dentro del término "poli(aminoácido)," tanto naturales como sintéticos. Estas proteínas incluyen, por ejemplo, enzimas, albúminas, proteínas séricas, por ejemplo, globulinas, lipoproteínas, anticuerpos y similares. El peso molecular de los poli(aminoácidos) será generalmente de al menos 5.000 y no tendrá límite superior, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 10.000.000, o de aproximadamente 15.000 a aproximadamente 600.000. Habitualmente habrá diferentes intervalos dependiendo del tipo de proteína implicada. Con proteínas marcadoras tales como, por ejemplo, enzimas, el intervalo será desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 600.000, o desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 300.000 de peso molecular. Hay habitualmente al menos 1 análogo de compuesto de sirolimus por aproximadamente 200.000 de peso molecular, o al menos 1 por aproximadamente 150.000 de peso molecular, o al menos 1 por aproximadamente 100.000 de peso molecular, o al menos 1 por aproximadamente 50.000 de peso molecular, etcétera. En el caso de enzimas, el número de grupos análogos de compuesto de sirolimus es habitualmente desde 1 hasta aproximadamente 20, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, de aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.

Enzimas de interés particular como proteínas marcadoras son enzimas redox, particularmente deshidrogenasas tales como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, etc., y enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante para dar un colorante. Combinaciones particulares incluyen sacarido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasa, u oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa o microperoxidasa. Se conocen en la técnica combinaciones de enzima adicionales. Cuando se usa una única enzima como marcador, pueden encontrar uso otras enzimas tales como hidrolasas, transferasas y oxidorreductasas, preferiblemente hidrolasas tales como fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa. Alternativamente, pueden usarse luciferasas tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana.

Las coenzimas ilustrativas que encuentran uso incluyen NAD[H], NADP[H], fosfato de piridoxal, FAD[H], FMN[H], etc., habitualmente coenzimas que implican reacciones de ciclación. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.318.980.

La expresión "marcadores que no son de poli(aminoácido)" incluye aquellos marcadores que no son proteínas (tales como enzimas). El marcador que no es de poli(aminoácido) puede detectarse directamente o puede detectarse a través de una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Los marcadores que no son de poli(aminoácido) incluyen, por ejemplo, radioisótopos, compuestos luminiscentes, soportes, por ejemplo, partículas, placas, perlas, etc., polinucleótidos, y similares. Más particularmente, el marcador puede ser isotópico o no isotópico, habitualmente no isotópico, y puede ser un polinucleótido que codifica para un catalizador, promotor, colorante, coenzima, sustrato enzimático, grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña (incluyendo, por ejemplo, biotina, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, y similares), secuencia de polinucleótido amplificable, un soporte tal como, por ejemplo, una partícula tal como partícula de látex o carbono o partícula de dióxido de cromo (cromo) o similar, sol metálico, cristalito, liposoma, célula, etc., que puede marcarse adicionalmente o no con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, y similares.

El soporte puede componerse de un material insoluble en agua, orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de varias formas, tales como partícula, incluyendo perla, película, membrana, tubo, pocillo, tira, varilla, superficies planas tales como, por ejemplo, placa, dendrímeros, y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede ser posible suspenderlo o no en el medio en el que se emplea. Ejemplos de soportes que pueden suspenderse son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc.; o bien usados por sí mismos o bien junto con otros materiales.

Un derivado de compuesto de sirolimus puede unirse a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, sólo siempre que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de los derivados para unirse con un anticuerpo. En algunas realizaciones, el derivado puede recubrirse o unirse covalentemente a la fase sólida o puede tener capas de una o más moléculas portadoras tales como poli(aminoácidos) incluyendo proteínas tales como albúminas séricas o inmunoglobulinas, o polisacáridos (hidratos de carbono) tales como, por ejemplo, dextrano o derivados de dextrano. También pueden usarse grupos conectores para acoplar covalentemente el soporte sólido y el compuesto de sirolimus. Otros métodos de unión de derivados de compuesto de sirolimus también son posibles. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un aglutinante para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina, un anticuerpo, etc., y una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc., puede unirse al derivado de compuesto de sirolimus o viceversa. La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y puede realizarse mediante técnicas bien conocidas, disponibles comúnmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cautrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970). En algunas realizaciones, el compuesto de sirolimus se une a un soporte sólido por medio de la posición 26 y adicionalmente mediante un grupo conector que comprende una funcionalidad oxima.

Las partículas deben tener un diámetro promedio de al menos 0,02 micras y no más de aproximadamente 100 micras. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de desde aproximadamente 0,05 micras hasta aproximadamente 20 micras, o desde aproximadamente 0,3 micras hasta aproximadamente 10 micras. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente desde aproximadamente 0,7 g/ml hasta aproximadamente 1,5 g/ml, y componerse de material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, virus, y similares. Las partículas también pueden ser partículas que se componen de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas, y similares. En algunas realizaciones, las partículas son partículas de cromo o partículas de látex.

Las partículas de polímero pueden formarse de polímeros de adición o condensación. Las partículas serán fácilmente dispersables en un medio acuoso y pueden ser adsorptivas o funcionalizables de modo que permitan la conjugación con un compuesto de sirolimus, o bien directa o bien indirectamente a través de un grupo conector. Las partículas también pueden derivarse de materiales que se producen de manera natural, materiales que se producen de manera natural que se modifican de forma sintética, y materiales sintéticos. Entre los polímeros orgánicos de interés particular están los polisacáridos, particularmente polisacáridos reticulados, tales como agarosa, que está disponible como Sepharose®, dextrano, disponible como Sephadex® y Sephacryl®, celulosa, almidón, y similares; polímeros de adición, tales como poliestireno, poli(alcohol vinílico), homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas que tienen funcionalidad de hidroxilo libre, y similares.

Un marcador de poli(aminoácido) o un marcador que no es de poli(aminoácido) puede ser un elemento de un sistema de producción de señales. El sistema de producción de señales puede tener uno o más componentes, siendo al menos un componente el marcador, ya sea de poli(aminoácido) o no sea de poli(aminoácido). El sistema de producción de señales genera una señal que está relacionada con la presencia de un compuesto de sirolimus en una muestra. El sistema de producción de señales incluye todos los reactivos requeridos para producir una señal medible. Otros componentes del sistema de producción de señales pueden estar incluidos en una disolución reveladora y pueden incluir sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos, sustancias de unión específica requeridas para la unión de sustancias generadoras de señales, y similares. Otros componentes del sistema de producción de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, y similares. El sistema de producción de señales proporciona una señal detectable mediante medios externos mediante el uso de radiación electromagnética, de manera deseable mediante examen visual. Se describen sistemas de producción de señales a modo de ejemplo en la patente estadounidense n.º 5.508.178 (Rose, *et al.*).

Los portadores inmunogénicos incluyen determinados poli(aminoácidos) y compuestos que no son poli(aminoácidos). Mediante la expresión "portador inmunogénico" se entiende un grupo que, cuando se conjuga con un hapteno forma un inmunógeno que se inyecta en un mamífero, induce una respuesta inmunitaria y provoca la producción de anticuerpos que se unen al hapteno. Los haptenos son compuestos que pueden unirse específicamente a anticuerpos correspondientes pero que no actúan por sí mismos como inmunógenos (o antígenos) para preparación de los anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos que reconocen un hapteno contra compuestos que se componen del hapteno unido a un portador (inmunogénico o antigénico). Los portadores inmunogénicos también se denominan algunas veces portadores antigénicos. Los portadores inmunogénicos típicos incluyen, sin limitación, poli(aminoácidos), polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas (materiales biológicos y sintéticos). Se da a conocer una amplia variedad de tales portadores en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, columna 4, línea 57 a columna 5, línea 5.

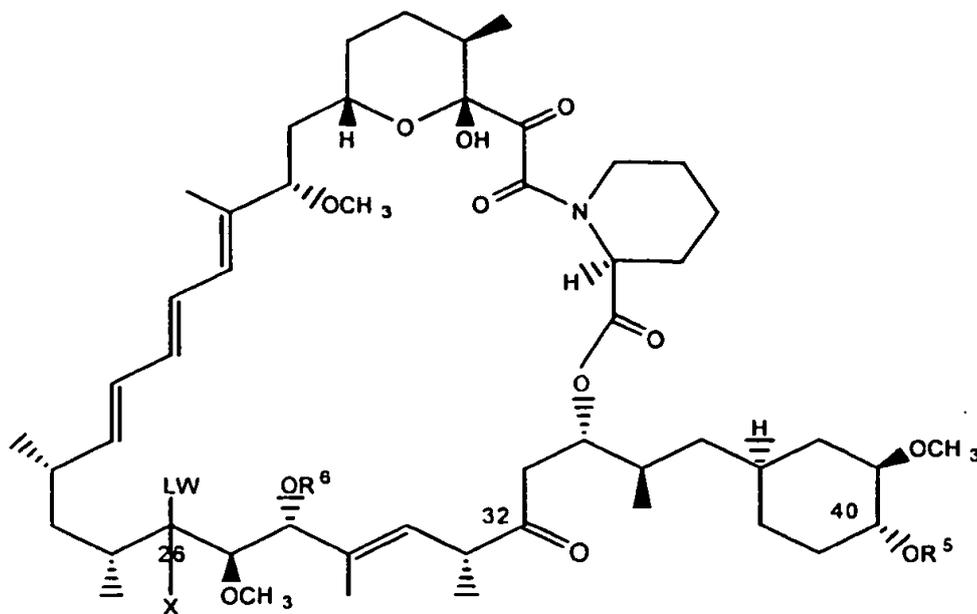
El intervalo de peso molecular (en Dalton) para poli(aminoácidos) que son portadores inmunogénicos tales como antígenos proteicos es de desde aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 10.000.000, desde aproximadamente 20.000 hasta aproximadamente 600.000, desde aproximadamente 25.000 hasta

aproximadamente 250.000 de peso molecular. Los portadores inmunogénicos de poli(aminoácido) incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas, proteínas séricas, por ejemplo, globulinas, proteínas del cristalino y lipoproteínas, etcétera. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana ("KLH"), ovoalbúmina de huevo, gamma-globulina bovina (BGG), y similares. Los portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido) incluyen polisacáridos, partículas, y similares.

Tal como se mencionó anteriormente, el portador inmunogénico puede ser un polisacárido, que es un polímero de alto peso molecular de monosacáridos que puede prepararse de manera natural o de manera sintética y habitualmente implica condensaciones repetidas de monosacáridos. Ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa, gomas de hidrato de carbono, tales como goma arábica, agar, etcétera. El polisacárido también puede contener residuos de poli(aminoácido) y/o residuos lipídicos.

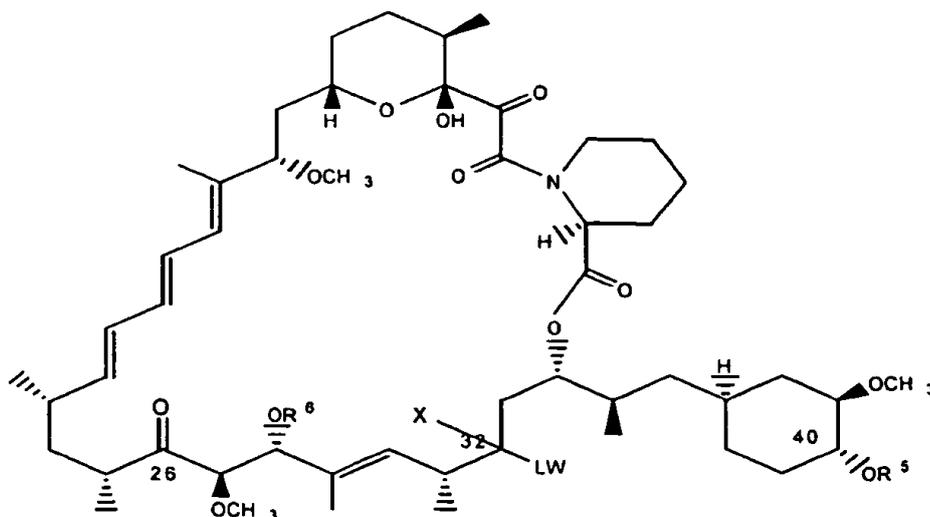
Las expresiones "restos de poli(aminoácido) que no son marcadores" y "restos de poli(aminoácidos) portadores que no son inmunogénicos" significan poli(aminoácidos) que no se consideran normalmente marcadores o portadores inmunogénicos aunque tales restos puede ser marcadores o portadores inmunogénicos en determinadas circunstancias. Por ejemplo, un anticuerpo puede no considerarse un marcador pero puede ser un marcador si el anticuerpo se modifica para incluir un resto de producción de señales o parte de un sistema de producción de señales. Además, un anticuerpo puede no considerarse como un portador inmunogénico pero, no obstante, puede ser un inmunogénico portador en determinadas circunstancias por su mayor peso molecular.

En algunas realizaciones, los conjugados anteriores tienen la estructura:



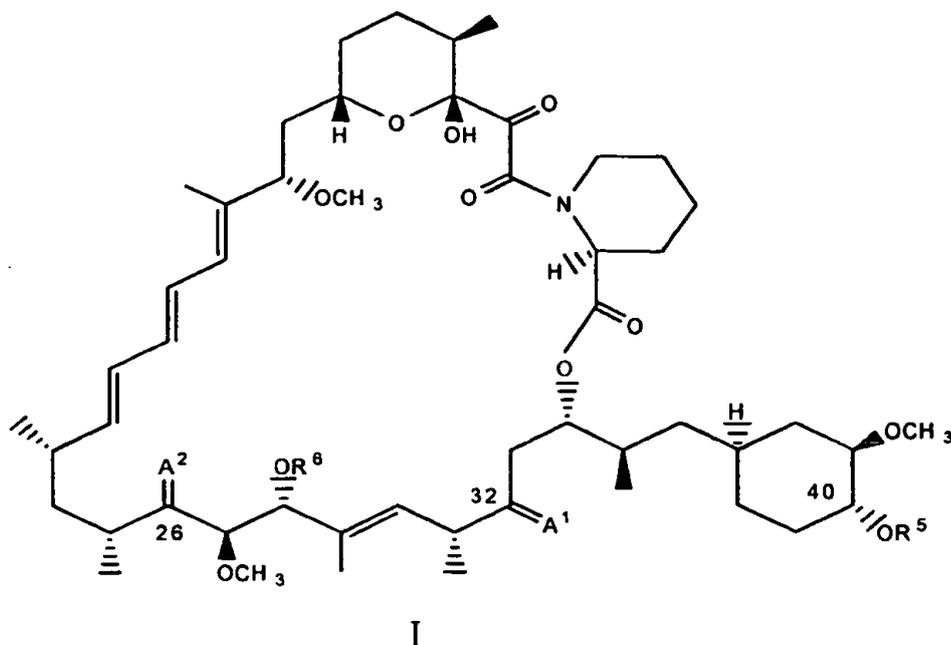
en la que L es un grupo conector, X es hidrógeno, R^5 y R^6 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-7} o $C(O)$ alquilo C_{1-6} , y W es un resto, seleccionado del grupo que consiste en poli(aminoácidos), restos de marcador que no son de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido), o, en algunas realizaciones, L es un grupo conector y W es una funcionalidad para la unión a un poli(aminoácido), un resto de marcador que no es de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) y similares. Tales funcionalidades incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, maleimidas, succinimidas, haloacetamidas (bromoacetamida, yodoacetamida, cloroacetamida, y similares), etcétera. En algunas realizaciones, L comprende una funcionalidad oxima.

En algunas realizaciones, los conjugados anteriores tienen la estructura:



5 en la que L es un grupo conector, X es hidrógeno, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆, y W es un resto, seleccionado del grupo que consiste en poli(aminoácidos), restos de marcador que no son de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido), o, en algunas realizaciones, L es un grupo conector y W es una funcionalidad para la unión a un poli(aminoácido), un resto de marcador que no es de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) y similares. Tales funcionalidades incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, maleimidas, succinimidas, haloacetamidas (bromoacetamida, yodoacetamida, cloroacetamida, y similares), etcétera. Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a anticuerpos policlonales producidos contra un compuesto de la estructura anterior en la que W es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o que no es de poli(aminoácido). En algunas realizaciones, los anticuerpos policlonales se producen contra un compuesto de la estructura anterior en la que L comprende una funcionalidad oxima.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a compuestos de estructura I:



15 en la que A¹ es oxo y A² es un grupo de fórmula la:

R⁴ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, bencilo, alqueno C₃₋₁₀, alquino C₃₋₁₀; y

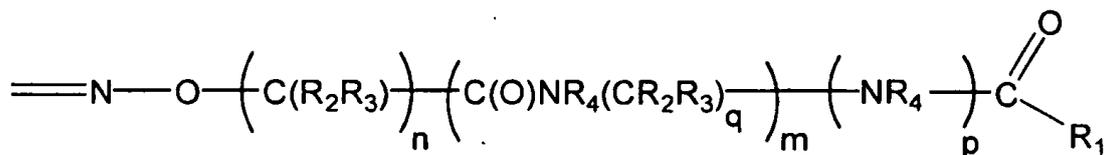
R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno; fenilo; fenilo sustituido en el que los sustituyentes son X, Y y Z; 1- o 2-naftilo; 1- o 2-naftilo sustituido en el que los sustituyentes son X, Y y Z; C(O)alquilo C₁₋₆; alquilo C₁₋₁₀; cicloalquilo C_{3-C10}; alquilo C₁₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆; fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆; alqueno C₃₋₁₀; cicloalqueno C₄₋₁₀; alqueno C₃₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆, fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆; alquino C₃₋₁₀; y alquino C₃₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆, fenilo, fenilo sustituido, en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆;

X, Y y Z se seleccionan independientemente de: hidrógeno; alquilo C₁₋₇; alqueno C₂₋₆; halógeno (incluyendo flúor, bromo, cloro y yodo); CN; C(O)H; grupos perhalosustituidos (incluyendo fluoro, bromo, cloro y yodo) tales como CF₃; SR⁷, en el que R⁷ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, CF₃ o fenilo; SOR⁷, en el que R⁷ es tal como se definió anteriormente; SO₂R⁷, en el que R⁷ es tal como se definió anteriormente; CONR⁵R⁶, en el que R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente; -(CH₂)_rOR⁸, en el que R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃; hidroxi-alquilo C₂₋₃, y r es 0-2; alquilo C₁₋₃; hidroxi-alquilo C₂₋₃; CH(OR⁹)(OR¹⁰), en el que R⁹ y R¹⁰ son alquilo C₁₋₃ o tomados juntos forman un puente de etilo o propilo; -(CH₂)_rOC(O)R⁸, en el que R⁸ y r son tal como se definieron anteriormente, y

-(CH₂)_rC(O)OR⁸, en el que R⁸ y r son tal como se definieron anteriormente.

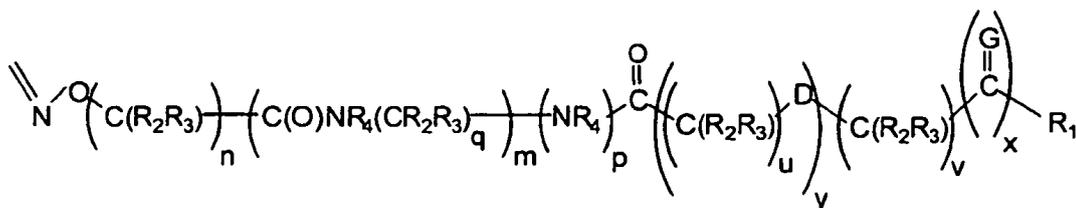
La expresión "al menos" tal como se usa en el presente documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual a o mayor que el número citado. La expresión "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento significa que el número citado puede diferir en más o menos el 20%; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4 a 6.

En algunas realizaciones de las anteriores, A¹ es oxo y A² es un grupo de fórmula Ib:



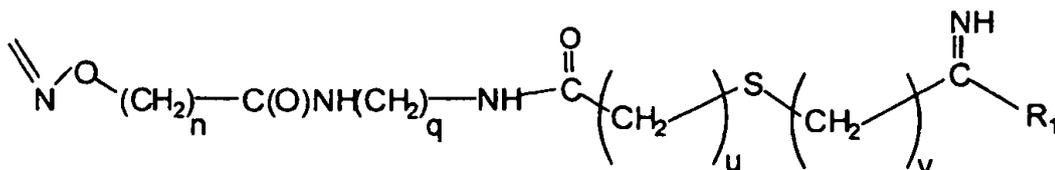
Ib

En algunas realizaciones de las anteriores, A¹ es oxo y A² es un grupo de fórmula Ic:



Ic

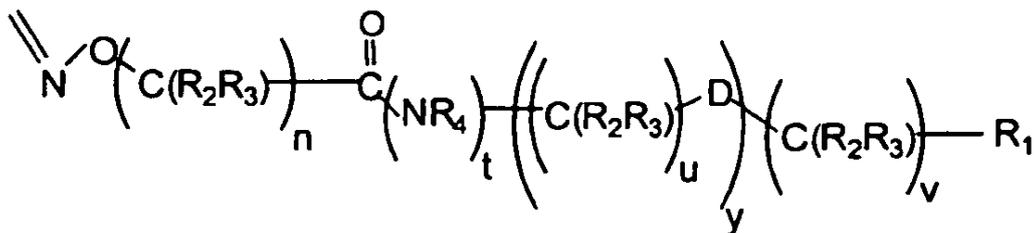
En una realización específica, el grupo de fórmula Ic es:



Ic'

e incluye sales de imina del mismo tal como, por ejemplo, sal de imina de ácidos minerales, por ejemplo, HCl. En otras realizaciones específicas del grupo anterior de fórmula Ic', n, q, u y v son 1.

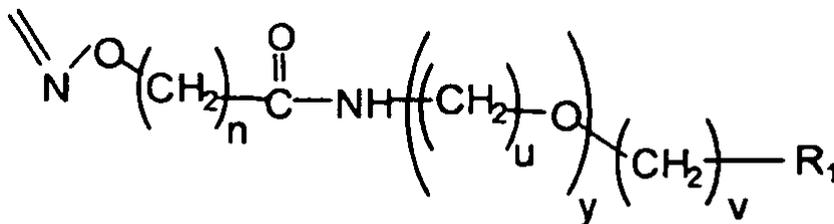
En algunas realizaciones de las anteriores, A¹ es oxo y A² es un grupo de fórmula Id:



Id

En una realización específica del grupo anterior Id, n es 1, t es 1, u es 2, y es 2 y v es 1.

Una realización específica del grupo Id es:



Id'

- 5 en la que n es 1, u es 2, y es 2 y v es 1 y en el que cualquier grupo R¹ se une a través de un grupo amino, incluyendo a modo de ilustración un grupo amino de una proteína, un grupo amino introducido en un polisacárido tal como, por ejemplo, aminodextrano, etcétera.

10 Los compuestos de la invención tienen centros asimétricos y esta invención incluye todos los isómeros ópticos y mezclas de los mismos. Además, los compuestos con dobles enlaces carbono-carbono pueden aparecer en las formas Z y E con todas las formas isoméricas de los compuestos que están incluidos en la presente invención. Cuando sea apropiado, los isómeros/estereoisómeros pueden separarse mediante procedimientos conocidos en la técnica y usarse individualmente.

15 Cuando cualquier variable (por ejemplo, alquilo, arilo, R¹, R², R³, etc.) aparece más de una vez en la estructura I, su definición en cada aparición es independiente de las demás. Por ejemplo, un compuesto de la invención incluye la estructura I en la que en cada aparición de R² puede estar presente el mismo R² o uno diferente.

20 Otra realización de la invención incluye los compuestos de estructura I en la que R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆, preferiblemente hidrógeno; A¹ es oxo; y A² está representado por un grupo de fórmula Ia, en la que R² y R³ son hidrógeno y n es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12, de aproximadamente 6 a aproximadamente 12, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, m es 0, p es 1; R⁴ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄, preferiblemente hidrógeno.

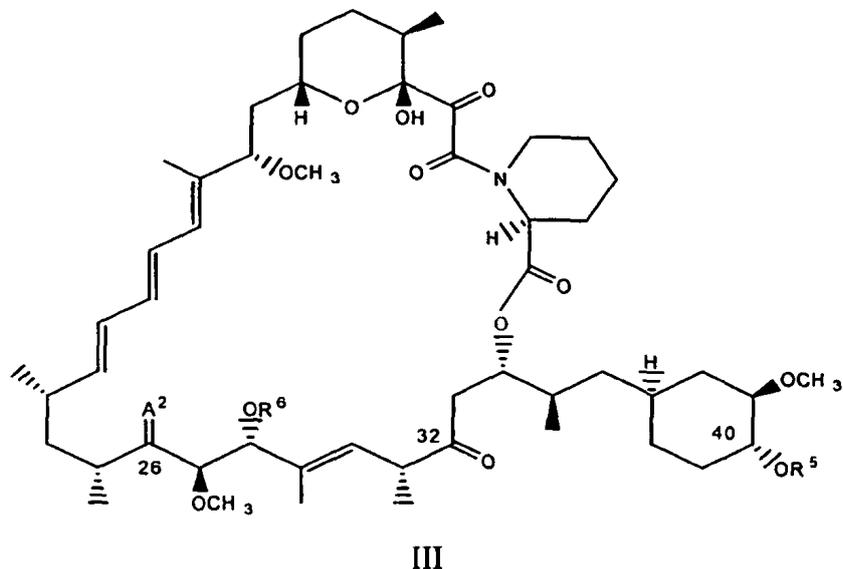
25 Otra realización de la invención incluye los compuestos de estructura I en la que R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆, preferiblemente hidrógeno; A¹ es oxo; y A² está representado por la fórmula Ia, en la que R² y R³ son hidrógeno y n es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12, de aproximadamente 1 a aproximadamente 9, de aproximadamente de 1 a aproximadamente 6, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, o 1, m es 1, q es de aproximadamente 1 a aproximadamente 9, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, o 1, y p es 1.

30 Otra realización de la invención incluye los compuestos de estructura I en la que R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆, preferiblemente hidrógeno; A¹ es oxo; y A² está representado por la fórmula Ia, en la que R² y R³ son hidrógeno y n es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12, de aproximadamente 6 a aproximadamente 12, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, m es 1, q es de 1 a aproximadamente 12, de 2 a aproximadamente 6, aproximadamente 2, p es 0.

Otra realización de la invención incluye los compuestos de estructura I: en la que R¹ y R² se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆, preferiblemente hidrógeno; A¹ es oxo; y A² está representado por la fórmula Ia, en la que R² y R³ son hidrógeno y n es de aproximadamente 1 a aproximadamente

12, de aproximadamente 6 a aproximadamente 12, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, m es 0, p es 0; y R⁴ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a compuestos de estructura III:



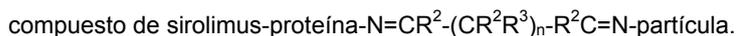
5 en la que A² es un grupo de fórmula la anterior o un grupo de fórmula Ib anterior o un grupo de fórmula Ic anterior o un grupo de fórmula Id anterior y realizaciones de los mismos tal como se identificó anteriormente de manera específica.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye aquellos grupos alquilo de un número designado de átomos de carbono de configuración lineal, ramificada o cíclica. Los ejemplos de "alquilo" incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec- y terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, norbornilo, y similares. El término "alqueno" incluye cadenas hidrocarbonadas de un número especificado de átomos de carbono de configuración lineal o ramificada y al menos una insaturación, que puede producirse en cualquier punto a lo largo de la cadena, tal como etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, dimetilpentenilo, y similares, e incluye formas E y Z, cuando sea aplicable. El término "alquino" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de un número especificado de átomos de carbono que contienen al menos un triple enlace carbono-carbono, incluyendo etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, y 2-butinilo. El término "alcoxilo" incluye grupos alquilo de un número designado de átomos de carbono de configuración lineal, ramificada o cíclica, en el que el grupo alquilo incluye un oxígeno de éter para la unión al compuesto original. El término "halógeno" incluye fluro, cloro, bromo y yodo.

20 Tal como se mencionó anteriormente, el compuesto de sirolimus puede unirse a una partícula. En algunas realizaciones, una partícula puede unirse a una proteína que está unida al compuesto de sirolimus tal como se trató anteriormente, por ejemplo, tal como se muestra en la estructura I con un grupo conector de fórmula Ia. En algunas realizaciones, un grupo amina de la proteína puede conjugarse con la partícula por medio de un grupo conector de fórmula en la que R² y R³ son tal como se definieron anteriormente:



Por ejemplo, En algunas realizaciones, el compuesto de sirolimus unido a la partícula puede tener la fórmula general en la que R² y R³ son tal como se definieron anteriormente:



30 En algunas realizaciones, una partícula puede unirse a un polisacárido tal como se trató anteriormente en el que el polisacárido se une al compuesto de sirolimus, por ejemplo, tal como se muestra en la estructura I con un grupo conector de fórmula Ia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto de sirolimus unido a la partícula puede tener la fórmula:



35 La síntesis de ejemplos representativos de los compuestos anteriores se trata en el presente documento a modo de ilustración y no de limitación. Otros procedimientos sintéticos se les ocurrirán a los expertos en la técnica

en vista de la descripción del presente documento. Pueden prepararse otros compuestos dentro del alcance de la presente invención usando variantes adecuadas de los reactivos empleados a continuación.

El grupo oxima puede añadirse a la rapamicina o sus derivados en presencia de una base débil tal como acetato de sodio (NaOAc). El disolvente preferido para la reacción es metanol/agua. En la mayoría de los casos, puede formarse compuestos de ácido de oxima C-26 y C-32 en una única etapa preparativa. Estos compuestos pueden entonces separarse usando cromatografía en capa fina (CCF) preparativa. Sin embargo, no siempre es necesario realizar la separación. Puede usarse una combinación de los C-26 y C-32 para simplicidad de fabricación.

Los compuestos de ácido de oxima pueden activarse mediante un agente de activación apropiado tal como, por ejemplo, dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y éster del ácido N-hidroxisuccínico (NHS), EDAC etcétera en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un éter, por ejemplo, tetrahidrofurano, 18-corona-6, etcétera, y combinaciones de los mismos. El compuesto activado resultante se hace reaccionar entonces con el grupo amina de una proteína tal como, por ejemplo, KLH, BSA, BGG y similares en un medio tamponado acuoso tal como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, etcétera, para dar conjugados de proteína-rapamicina.

Alternativamente, el compuesto activado resultante puede hacerse reaccionar con el grupo amina de un resto conector. Por ejemplo, el compuesto activado resultante puede hacerse reaccionar con una alquilendiamina, por ejemplo, etilendiamina, en las que uno de los grupos amina está en la forma de una amida de un ácido carboxílico C₁-C₁₀ halogenado tal como, por ejemplo, ácido bromoacético, etc., y el otro grupo amina está en la forma de un bromhidrato. La reacción puede llevarse a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un hidrocarburo halogenado, por ejemplo, cloruro de metileno en presencia de una base orgánica tal como una mono-, di-, y tri-alquilamina, por ejemplo, diisopropiletamina (DIPEA). Otras bases adecuadas incluyen etilamina, dietilamina, trietilamina, etcétera. El producto resultante tiene un bromoalquileo terminal que puede hacerse reaccionar con una funcionalidad tiol que está presente en o se introduce en el resto al que va a unirse. Por ejemplo, un grupo tiol puede introducirse en una proteína mediante la reacción con, por ejemplo, clorhidrato de 2-iminotiolano y similares. El medio es habitualmente un medio tamponado tal como, por ejemplo, medio tamponado con fosfato acuoso y similares. La conjugación con la proteína puede realizarse en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, dimetilformamida (DMF), éteres, y similares para dar conjugados de proteína-rapamicina.

Los conjugados de rapamicina a superficies sólidas o soportes tales como, por ejemplo, partículas, pueden realizarse haciendo reaccionar compuestos de ácido de oxima activados con una proteína tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina, en un medio tamponado acuoso tal como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato a aproximadamente pH neutro. Una partícula tal como, por ejemplo, una partícula de cromo o similar, se derivatiza con un resto conector adecuado tal como, por ejemplo, un resto conector obtenido haciendo reaccionar un grupo amino en la partícula con un dialdehído tal como, por ejemplo, glutaraldehído y similares. Este compuesto de partículas en combinación con el reactivo de inmunoglobulina produce el conjugado de partícula-rapamicina deseado.

Alternativamente, conjugados de rapamicina a superficies sólidas o soportes tales como, por ejemplo, partículas, pueden realizarse haciendo reaccionar compuestos de ácido de oxima activados con un derivado de dextrano. Por ejemplo, un grupo amino de una partícula tal como, por ejemplo, una partícula de cromo, puede hacerse reaccionar con un dextrano funcionalizado tal como, por ejemplo, aldehído de dextrano. La reacción se realiza en presencia de un agente reductor tal como, por ejemplo, NaCNBH₃, y similares en un medio tamponado acuoso tal como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato a un pH de aproximadamente 6. El conjugado de dextrano funcionalizado-partícula se hace reaccionar entonces con compuestos de ácido de oxima activados para dar los conjugados de partícula-rapamicina deseados.

Otros enfoques para la preparación de compuestos según realizaciones de la presente invención se les ocurrirán a los expertos en la técnica en vista de la descripción del presente documento.

Pueden prepararse conjugados enzimáticos a partir de compuestos según la presente invención. En general, grupos funcionales adecuados para la unión del compuesto a la enzima son habitualmente un agente alquilante o éster activado cuando el/los aminoácido(s) que van a conjugarse en la enzima tienen grupos amino o hidroxilo y son habitualmente agentes alquilantes o similares cuando el/los aminoácido(s) que van a conjugarse en la enzima comprende un átomo de azufre tal como, por ejemplo, una cisteína. Un gran número de grupos funcionales adecuados están disponibles para unirse a grupos amino y alcoholes tales como ésteres activados que incluyen ésteres imídicos, ésteres sulfónicos y ésteres de fosfato, nitritos activados, aldehídos, cetonas, agentes alquilantes y similares. La conjugación de haptenos a proteínas usando estos y otros grupos de unión se conoce bien en la técnica y se describe en revisiones tales como por ejemplo, Maggio, E.T. "Enzyme-Immunoassay" (CRC Press, Boca Raton, Fla., 1980), capítulo 4, que contiene una variedad de técnicas de conjugación; véanse por ejemplo las páginas 81-88. Estas técnicas pueden emplearse para unir los presentes compuestos de sirolimus (haptenos) a enzimas para formar conjugados de enzima-compuesto de sirolimus.

Tras la reacción de la enzima con un compuesto tal como se trató anteriormente para formar un conjugado, entonces se purifica el producto opcionalmente según pueda requerirse. La purificación y caracterización de conjugados de poli(aminoácido)-hapteno, en general, se ha descrito en detalle Maggio, *et al.*; "Enzyme-

Immunoassay" (CRC Press, Boca Raton, Fla., 1980), capítulo 4, véanse por ejemplo las páginas 86-88. Por ejemplo, si el conjugado es un conjugado de hapteno-G6PDH mutante, la purificación puede ser mediante diálisis frente a disoluciones acuosas/orgánicas y acuosas tales como agua/DMF (dimetilformamida) o agua, o mediante cromatografía de filtración en gel sobre soportes tales como Sephadex®, y similares.

5 Tal como se mencionó anteriormente, la conjugación puede implicar la unión de un hapteno a un grupo tiol libre presente en una cadena lateral de aminoácido de la enzima (por ejemplo cisteína). Tal conjugación implica la alquilación del átomo de azufre de tiol mediante el tratamiento con un compuesto electrófilo tal como una amida, cetona, éster alfa- o beta-insaturados, o similar, o un agente alquilante tal como un haluro reactivo, por ejemplo, bromuro, o sulfonato o similar o reacción con un disulfuro activo tal como un disulfuro de 2- nitro-4-carboxifenilo. LOs
10 ejemplos específicos a modo de ilustración y no de limitación incluyen alfa-bromoamidas, maleimidias, vinilsulfonas, alfa-yodocetonas, y similares. El compuesto electrófilo en la presente circunstancia sería un compuesto de sirolimus con un grupo conector que tiene una funcionalidad tal como se trató anteriormente para la unión a, por ejemplo, una enzima.

15 Las reacciones de conjugación con enzimas pueden verse afectadas por varios factores. Éstos incluyen, pero no se limitan a, pH, temperatura, tampón, fuerza iónica, sustancias que pueden proteger el sitio activo de la enzima, cantidad y tipo de codisolvente, tiempo de reacción y química de activación. Un intervalo de valores de pH de desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 9,5 puede usarse habitualmente para las reacciones de conjugación. Estas reacciones se llevan a cabo generalmente a de aproximadamente 0 a aproximadamente 40°C, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 20°C.

20 Pueden usarse varios tampones y sales, tanto solos como en combinación, para tales reacciones. Éstos incluyen Tris, bicarbonato, fosfato, pirofosfato, etilendiaminetetraacetato (EDTA), KCl, NaCl, y muchos otros. El sitio activo puede protegerse mediante sustratos (es decir glucosa-6-fosfato para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), cofactores (NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH) y análogos de cofactores (tio-NAD⁺, tio-NADH, tio-NADP⁺ o tio-NADPH), y compuestos que reaccionan de manera reversible con lisina (es decir, piridoxal) para reducir la desactivación de la
25 enzima durante la conjugación.

30 LOs codisolventes que pueden mejorar la solubilidad del compuesto de sirolimus incluyen, pero no se limitan a, dimetilformamida, carbitol, dimetilsulfóxido, 1-metil-2-pirrolidinona y 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona. Éstos pueden ser útiles a de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 30% del volumen de reacción. Las reacciones puede variar desde aproximadamente 15 minutos hasta muchos días, según la química de activación. Los compuestos carboxílicos pueden activarse para formar ésteres con N-hidroxisuccinimida o su sulfoanálogo, o para dar anhídridos mixtos a través de la reacción con cloroformiato de carbitol o cloroformiato de t-butilo, o pueden acoplarse directamente usando carbodiimidias tales como clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Para la reacción con tioles de cisteína en la enzima, el compuesto de sirolimus debe contener un buen grupo saliente tal como I, Br o tosilo; alternativamente, el hapteno puede contener
35 un tiol, preferiblemente activado con 2,2'-ditiodipiridina o 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB).

Otro método de conjugación, descrito en Rowley, G. L., D. Leung y P. Singh (patente estadounidense. n.º 4.220.722) implica la modificación de la enzima con reactivos que contienen bromoacetilo; los grupos bromo se hacen reaccionar posteriormente con haptenos que contienen tiol. La reacción de la enzima con modificador de bromoacetilo, y la bromoacetil-enzima con el hapteno tiolado, se someten a las mismas variables de condiciones de
40 reacción descritas anteriormente.

Cualquiera de los compuestos tratados anteriormente puede purificarse mediante técnicas conocidas tales como, por ejemplo, diálisis, cromatografía, y combinaciones de las mismas.

45 Los conjugados inmunogénicos de la presente invención se emplean para preparar anticuerpos para un compuesto de sirolimus para la detección de un compuesto de sirolimus en una muestra de la que se sospecha que contiene el mismo. Los anticuerpos específicos para un compuesto de sirolimus para su uso en inmunoensayos pueden ser monoclonales o policlonales. Tales anticuerpos pueden prepararse mediante técnicas que se conocen bien en la técnica tales como inmunización de un huésped y recogida de sueros (policlonales) o mediante la preparación de líneas celulares híbridas continuas y la recogida de la proteína secretada (monoclonal) o mediante la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutageneizadas de los mismos que codifican para
50 al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales.

Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, en la que las inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión para una molécula particular.
55

Se obtiene antisuero que contiene anticuerpos (policlonales) mediante técnicas bien establecidas que implican la inmunización de un animal, tal como un conejo, cobaya o cabra, con un inmunógeno apropiado y obteniendo antisueros a partir de la sangre del animal inmunizado tras un periodo de espera apropiado. Se

proporcionan revisiones del estado de la técnica por Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., U.S., 1976), Butler, J. Immunol. Meth. 7: 1-24 (1975); Broughton y Strong, Clin. Chem. 22: 726-732 (1976); y Playfair, *et al.*, Br. Med. Bull. 30: 24-31 (1974).

5 También pueden obtenerse anticuerpos mediante técnicas de hibridación de células somáticas, denominándose frecuentemente tales anticuerpos, anticuerpos monoclonales. Pueden producirse anticuerpos monoclonales según las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, Nature 265:495-497, 1975. Se encuentran revisiones de técnicas para anticuerpos monoclonales en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, *et al.* Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980), y Methods of Enzymology 73 (Parte B): 3-46 (1981). Se inyectan muestras de preparación de un inmunógeno apropiado en un animal tal como un ratón y, tras un tiempo suficiente, se sacrifica el animal y se obtienen células de bazo. Alternativamente, las células de bazo de un animal no inmunizado puede sensibilizarse con el inmunógeno *in vitro*. Los cromosomas de las células de bazo que codifican para las secuencias de base para las inmunoglobulinas deseadas pueden condensarse mediante la fusión de las células de bazo, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol, con una línea celular de mieloma. Las células resultantes, que incluyen hibridomas fusionados, se les permiten crecer en un medio selectivo, tal como en un medio HAT, y las células inmortalizadas supervivientes se cultivan en tales medios usando condiciones de dilución limitantes. Las células se hacen crecer en un recipiente adecuado, por ejemplo, pocillos de microtitulación, y el sobrenadante se examina para determinar anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada.

20 Existen diversas técnicas para la mejora de los rendimientos de anticuerpos monoclonales, tales como la inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped mamífero, que acepta las células, y permite la recogida del líquido ascítico. Cuando se recoge una cantidad insuficiente del anticuerpo monoclonal en el líquido ascítico, se recoge el anticuerpo de la sangre del huésped. Alternativamente, la célula que produce el anticuerpo deseado puede hacerse crecer en un dispositivo de cultivo de celulares de fibra hueca o un dispositivo de matraz de agitación, que se conocen bien ambos en la técnica. Existen diversos modos convencionales para el aislamiento y la purificación de los anticuerpos monoclonales de otras proteínas y sus contaminantes (véase Köhler y Milstein, citado anteriormente).

30 En otro enfoque para la preparación de anticuerpos de la secuencia que codifica para los sitios de unión a anticuerpos pueden cortarse del ADN cromosómico e insertarse en un vector de clonación, que puede expresarse en una bacteria para producir proteínas recombinantes que tienen los sitios de unión a anticuerpos correspondientes. En general, los anticuerpos pueden purificarse mediante técnicas conocidas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía DEAE, cromatografía ABx, y similares, filtración, etcétera. Los anticuerpos pueden usarse en inmunoensayos para detectar la presencia o la cantidad de un compuesto de sirolimus tal como, por ejemplo, rapamicina. Además, los anticuerpos pueden estar marcados o no marcados o pueden unirse a un soporte sólido.

35 Un anticuerpo seleccionado para su uso en un inmunoensayo para detectar rapamicina, por ejemplo, debe unir específica y preferentemente la rapamicina y sus metabolitos farmacéuticamente activos con otros ligandos tales como otros metabolitos o fármacos afines tales como FK 506 (tacrolimus). En general, un anticuerpo debe poder distinguir entre un ligando con respecto a un segundo ligando. Al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, del primer ligando o ligandos se unirá al anticuerpo si el anticuerpo se combina con una muestra que contiene los ligandos. Aunque la unión también depende de la concentración relativa de los ligandos, la unión será mayor para el primer ligando si la constante de unión para el primer ligando es mayor que la constante de unión para el segundo ligando, al menos aproximadamente 10 veces mayor o al menos aproximadamente 50 veces mayor y hasta 1000 veces o mayor. La expresión "al menos aproximadamente" significa que el número de ligandos unidos es igual a o mayor que el número designado y que el número designado puede variar en más o menos el diez por ciento.

45 En una realización específica, se produce un anticuerpo policlonal o monoclonal contra un compuesto anterior en el que el resto es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) en la posición 26.

50 Los conjugados de marcador y/o anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en sistemas de reactivos para la realización de diversos formatos de ensayos. Tales ensayos habitualmente implican reacciones entre parejas de unión tales como un analito de compuesto de sirolimus y un anticuerpo correspondiente o la unión entre un anticuerpo y una pareja de unión correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo. Por consiguiente, la pareja de unión puede ser una proteína, que puede ser un anticuerpo o un antígeno. La pareja de unión puede ser un elemento de un par de unión específico ("elemento sbp"), que es una de dos moléculas diferentes, que tienen una zona en la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a y de ese modo se define como complementaria con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los elementos del par de unión específico habitualmente serán elementos de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específicos tales como biotina-avidina, hormonas-receptores hormonales, enzima-sustrato, dúplex de ácido nucleico, IgG-proteína A, pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, y similares no son pares inmunológicos pero están incluidos en el alcance de elemento sbp.

Por consiguiente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes entre sí en comparación con el reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otra parte, la unión no específica implica la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras superficiales específicas. La unión no específica puede resultar de varios factores que incluyen interacciones hidrófobas entre moléculas. Las parejas de unión preferidas son anticuerpos.

Los reactivos mencionados anteriormente pueden emplearse en todos los tipos de inmunoensayos para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito del compuesto de sirolimus en una muestra de la que se sospecha que contiene tales analitos. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados comprenden habitualmente la formación de complejos antígeno-anticuerpo relativamente grandes. Los ensayos de este tipo incluyen, por ejemplo, métodos con inmunoprecipitina y de aglutinación y técnicas de dispersión de la luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos antígeno-anticuerpo. Los inmunoensayos marcados incluyen inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos por polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayo de inhibición, ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, luminiscencia inducida, etcétera.

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos que usan los conjugados marcados de la invención con una concentración limitada de anticuerpo. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de todos los reactivos principales. Los ensayos de este tipo incluyen ensayos tipo *sándwich* de dos sitios, por ejemplo, ensayos inmunorradiométricos, ensayos inmunofluorométricos, ensayos inmunoquimioluminométricos, ensayos ELISA, etcétera. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos sin separación en los que los reactivos marcados modulan la señal del marcador tras reacciones de unión antígeno-anticuerpo. Otro grupo de ensayos incluye ensayos competitivos limitados por reactivos de anticuerpos marcados para hapteno o antígeno que evitan el uso de antígenos o haptenos marcados problemáticos. En este tipo de ensayo, el analito inmovilizado en fase sólida está presente en una cantidad limitada, constante. El reparto de un marcador entre el analito inmovilizado y el analito libre depende de la concentración del analito en la muestra.

Los ensayos pueden realizarse o bien sin separación (homogéneos) o bien con separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se muestran a modo de ejemplo mediante el ensayo EMIT[®] (Syva Company, San José, CA) dado a conocer en Rubenstein, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.817.837, de la columna 3, línea 6 a la columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los dados a conocer en Ullman, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.996.345, de la columna 17, línea 59, a la columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los dados a conocer en Maggio, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.233.402, de la columna 6, línea 25 a la columna 9, línea 63; el inmunoensayo por polarización de fluorescencia ("FPIA") tal como se da a conocer, por ejemplo, en, entre otros, la patente estadounidense n.º 5.354.693; etcétera.

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por modulación enzimática ("EMMIA") tratado en Ngo y Lenhoff, *FEBS Lett.* (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia de sustrato marcado ("SLFIA") dado a conocer por Oellerich, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1984) 22:895-904; los inmunoensayos de donador enzimático combinado ("CEDIA") dado a conocer por Khanna, *et al.*, *Clin. Chem. Acta* (1989) 185:231-240; inmunoensayos de partículas marcadas homogéneos tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica potenciada con partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas ("PETIA"), etc.; y similares.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos enzimáticos en membranas ("EMIA"); luminoinmunoensayos ("LIA"); etcétera. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos con inmunosensores que implican la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie con anticuerpo inmovilizado tras la unión de un antígeno o hapteno. Los ensayos de este tipo incluyen, por ejemplo, ensayos con inmunosensores ópticos, ensayos con inmunosensores acústicos, ensayos con inmunosensores semiconductores, ensayos con inmunosensores transductores electroquímicos, ensayos con inmunosensores potenciométricos, ensayos con electrodos amperométricos inmunosensor ensayos, y similares.

Ejemplos de ensayos heterogéneos son el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas ("ELISA") mencionado en resumen anteriormente y tratado en Maggio, E.T. citado anteriormente; el radioinmunoensayo, dado a conocer en Yalow, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 39:1157 (1960), etcétera. Los conjugados y anticuerpos de compuesto de sirolimus pueden emplearse en un inmunoensayo de luminiscencia inducida, que se describe en la patente estadounidense n.º 5.340.716 (Ullman, *et al.*) titulada "Assay Method Utilizing Photoactivated Chemiluminescent Label" ("ensayo de luminiscencia inducida"). En un enfoque, el ensayo usa una partícula que incorpora un fotosensibilizador y una partícula marcadora que incorpora un compuesto quimioluminiscente. La partícula marcadora se conjuga con un elemento sbp que puede unirse a un analito para formar un complejo, o a un segundo elemento sbp para formar un complejo, en relación con la presencia del analito. Si el analito está presente, el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente entran en proximidad cercana. El fotosensibilizador genera un oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando los dos marcadores están en proximidad cercana. El compuesto quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que a su vez está relacionada con la cantidad de analito presente.

A modo de ilustración adicional, se emplea una partícula quimioluminiscente, que comprende el compuesto quimioluminiscente asociado con la misma tal como mediante la incorporación en la misma o la unión a la misma. Un elemento sbp que se une al analito, tal como, por ejemplo, un anticuerpo para un compuesto de sirolimus producido a partir de los conjugados de portador inmunogénico mencionados anteriormente, se une a un polisacárido que recubre estas partículas. Un segundo elemento sbp que se une al analito es parte de un conjugado de biotina. Se conjuga la estreptavidina a un segundo conjunto de partículas que tienen un fotosensibilizador asociado con las mismas. La unión de la estreptavidina a este segundo conjunto de partículas (partículas fotosensibilizadoras) puede implicar o no un polisacárido en las partículas. Se mezclan las partículas quimioluminiscentes con una muestra de la que se sospecha que contiene un analito del compuesto de sirolimus y las partículas fotosensibilizadoras. Se incuba el medio de reacción para permitir que las partículas se unan al analito en virtud de la unión de los elementos sbp al analito. Entonces, se irradia el medio con luz para excitar el fotosensibilizador, que puede en su estado excitado activar el oxígeno a un estado singlete. Dado que el compuesto quimioluminiscente de uno de los conjuntos de partículas está ahora en proximidad cercana al fotosensibilizador en virtud de la presencia del analito, se activa mediante el oxígeno singlete y emite luminiscencia. Entonces se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando relacionada la presencia de las mismas con la presencia del analito del compuesto de sirolimus.

Otro ejemplo particular de un ensayo en el que los presentes conjugados y anticuerpos tienen aplicación se trata en la patente estadounidense n.º 5.616.719 (Davalian, *et al.*), que describe inmunoensayos de canalización de oxígeno fluorescentes.

Los reactivos anteriores también pueden emplearse en inmunoensayos de múltiples analitos en los que el analito del compuesto de sirolimus puede ser el objeto de detección junto con uno o más de otros analitos tales como otros fármacos y similares. Se describen sistemas de múltiples analitos de este tipo, por ejemplo, en Loor, *et al.*, J. Anal. Toxicol. 12: 299 (1988).

Los ensayos homogéneos y heterogéneos tratados anteriormente se llevan a cabo normalmente en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir desde el 0,1 hasta aproximadamente el 40 por ciento en volumen de un codisolvente. El pH para el medio estará habitualmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH será habitualmente un equilibrio entre la unión óptima de los elementos de unión de cualquier par de unión específico, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como elementos del sistema de producción de señales, etcétera.

Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El tampón particular empleado no es crítico para esta invención, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro tampón. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de tampones, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Frecuentemente, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similares.

Pueden aplicarse uno o más periodos de incubación al medio a uno o más intervalos incluyendo cualquier intervalo entre la adición de los diversos reactivos mencionados anteriormente. Habitualmente se incuba el medio a una temperatura y durante un tiempo suficientes para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y habitualmente temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan desde aproximadamente 5° hasta aproximadamente 99°C, habitualmente desde aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 70°C, más habitualmente de 20°C a aproximadamente 45°C. El periodo de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 6 horas, habitualmente, desde aproximadamente 2 segundos hasta aproximadamente 1 hora, más habitualmente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos. El periodo de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos, que se determina mediante la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación. Las temperaturas durante las mediciones oscilarán generalmente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50°C, más habitualmente desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 40°C.

La concentración del analito que puede someterse a ensayo generalmente varía desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-17} M, más habitualmente desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-14} M. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (en relación con la cantidad de analito presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos. Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinarán generalmente mediante el intervalo de concentración de interés del analito del compuesto de sirolimus. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos se determina normalmente de manera empírica para optimizar la sensibilidad del ensayo a lo largo del intervalo. Es decir, una

variación en la concentración del analito que es de significación debe proporcionar una diferencia de señal medible de manera precisa. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema de producción de señales y la naturaleza de los analitos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

5 Aunque puede variarse ampliamente el orden de adición, existirán determinadas preferencias que dependen de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más sencillo es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, los reactivos pueden combinarse de manera secuencial. Opcionalmente, puede estar implicada una etapa de incubación posterior a cada adición tal como se trató anteriormente.

10 Los siguientes ejemplos describen además las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación y pretenden describir y no limitar el alcance de la invención.

15 En un ensayo homogéneo tras haberse combinado todos los reactivos, se determina la señal y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra. Por ejemplo, en un ensayo EMIT para un compuesto de sirolimus, se combina una muestra de la que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus en un medio acuoso o bien simultáneamente o bien secuencialmente con un conjugado enzimático de un compuesto de sirolimus de la invención y el anticuerpo que puede reconocer un compuesto de sirolimus. Generalmente, se añade un sustrato para la enzima, lo que da como resultado la formación de un producto cromogénico o fluorogénico tras la reacción catalizada por enzima. Las enzimas preferidas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina pero pueden emplearse otras enzimas. Los analitos y los restos del conjugado enzimático compiten por los sitios de unión en el anticuerpo. Entonces se determina la actividad enzimática en el medio, habitualmente mediante medios espectrofotométricos, y se compara en cuanto a la actividad enzimática determinada cuando se someten a prueba calibradores o muestras de referencia en las que está presente una cantidad conocida de los analitos. Normalmente, se someten a prueba los calibradores de una manera similar a las pruebas de la muestra de la que se sospecha que contiene los analitos. Normalmente los calibradores contienen concentraciones diferentes, pero conocidas, del analito que va a determinarse. Preferiblemente, los intervalos de concentración presentes en los calibradores abarcan el intervalo de las concentraciones del analito sospechoso en las muestras no conocidas.

25 Los ensayos mencionados anteriormente pueden llevarse a cabo usando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mutante como la enzima del conjugado enzimático. Esta enzima mutante se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 6.090.567 y 6.033.890. Además, el ensayo puede realizarse usando anticuerpos para un compuesto de sirolimus y usando los procedimientos tal como se dan a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.328.828 y 5.135.863.

30 Los ensayos heterogéneos implican habitualmente una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se da a conocer una variedad de formatos de ensayo competitivos y no competitivos en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, de la columna 14, línea 25 a la columna 15, línea 9. En un tipo de ensayo competitivo que usa reactivos según las realizaciones de la presente invención, un soporte, tal como se trató anteriormente, que tiene anticuerpos para un compuesto de sirolimus unidos al mismo está en contacto con un medio que contiene la muestra y conjugados enzimáticos apropiados de la invención. Tras separar el soporte y el medio, se determina la actividad enzimática del soporte o el medio mediante técnicas convencionales y relacionadas con la presencia y/o cantidad de un compuesto de sirolimus en la muestra.

35 La activación de un sistema de producción de señales depende de la naturaleza de los elementos del sistema de producción de señales. Para aquellos elementos de un sistema de producción de señales que se activan con luz, se irradia con luz el elemento. Para los elementos de sistemas de producción de señales que están en la superficie de una partícula, la adición de una base puede dar como resultado la activación. Se les ocurrirán otros métodos de activación a los expertos en la técnica en vista de las descripciones en el presente documento. Para algunos sistemas de producción de señales, no es necesario ningún agente para la activación tales como aquellos sistemas que implican un marcador que es un marcador radiactivo, una enzima, etcétera. Para sistemas enzimáticos, puede ser necesaria la adición de un sustrato y/o un cofactor.

40 En determinadas realizaciones, puede emplearse una segunda enzima además de la enzima del conjugado enzimático. Las enzimas del par de enzimas están relacionadas porque un producto de la primera enzima sirve como un sustrato para la segunda enzima.

50 El examen para determinar la presencia y la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, lo que es de manera general simplemente una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, instrumento fotográfico y similares. La presencia y la cantidad de la señal detectada están relacionadas con la presencia y la cantidad del compuesto de sirolimus presente en una muestra. Las temperaturas durante las mediciones oscilan generalmente desde aproximadamente 10° hasta aproximadamente 70°C, más habitualmente desde aproximadamente 20° hasta aproximadamente 45°C, más habitualmente de aproximadamente 20° a aproximadamente 25°C. En un enfoque, se forman curvas patrón usando concentraciones conocidas de los analitos que van a examinarse. Tal como se trató anteriormente, también pueden usarse calibradores y otros controles. La

muestra analizada puede ser un tejido biológico, incluyendo tejido extirpado de un órgano u otra parte del cuerpo y líquidos corporales, por ejemplo, sangre completa, plasma, suero, orina, saliva, semen, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, mucosidad y similares. En muchos casos, la muestra es plasma o suero.

5 Otra realización de un formato de ensayo es un ensayo de captura. En este formato de ensayo, el anticuerpo para rapamicina se une de manera covalente a una partícula magnética. Se incuba la muestra con estas partículas para permitir que la rapamicina en la muestra se una a los anticuerpos. Posteriormente, se incuba una enzima que tiene rapamicina o un derivado de rapamicina unido de manera covalente, con las partículas magnéticas. Tras lavado, se mide la cantidad de enzima que está unida a las partículas magnéticas y está inversamente relacionada con la presencia y/o la cantidad de rapamicina en la muestra.

10 Las siguientes descripciones específicas del ensayo son a modo de ilustración y no de limitación en el alcance de la presente invención. La selección de rapamicina como el compuesto de sirolimus es también a modo de ilustración y no de limitación ya que la presente invención tiene aplicación general para la detección de compuestos de sirolimus.

15 En una realización, pueden usarse los compuestos de rapamicina-marcador de las realizaciones de esta invención en un inmunoensayo o un ensayo basado en receptores como la primera parte de la molécula de detección mezclando la muestra de prueba o un patrón de rapamicina con un conjugado de rapamicina-oxima tal como un éster de biotina de rapamicina y permitiéndoles competir para la unión al anticuerpo o un receptor tal como una proteína de unión FK. Tras aclarar con un tampón de lavado apropiado, puede usarse una molécula de detección que consiste en estreptavidina o avidina conjugada a una enzima, molécula fluorescente o quimioluminiscente o resto radiactivo.

20 En una realización, el ensayo es un ensayo de luminiscencia inducida tal como se describió anteriormente. Los reactivos incluyen dos reactivos en perlas de látex y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-rapamicina biotinilado. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo producido contra un inmunógeno de rapamicina en la posición 26 o la posición 32 tal como se describió anteriormente o puede ser un anticuerpo producido contra un inmunógeno de rapamicina conocido. Se recubre el primer reactivo en perlas con rapamicina o un análogo de rapamicina y contiene un colorante quimioluminiscente. La rapamicina recubierta sobre el primer reactivo en perlas puede unirse a la superficie del primer reactivo en perlas mediante la unión a través de la posición 26 o la posición 32 según las realizaciones tratadas anteriormente o puede unirse en otras posiciones tal como se conoce en la técnica. Al menos uno del anticuerpo para rapamicina o la rapamicina en el primer reactivo en perlas es según las realizaciones de la invención tratadas anteriormente. Se recubre el segundo reactivo en perlas con estreptavidina y contiene un colorante fotosensibilizador. En una primera etapa, se incuba la muestra con anticuerpo biotinilado, lo que permite que la rapamicina de la muestra sature una fracción del anticuerpo biotinilado, lo que está relacionado directamente con la concentración de rapamicina. En una segunda etapa, se añade el primer reactivo en perlas y conduce a la formación de inmunocomplejos de perla/ anticuerpo biotinilado con la fracción no saturada del anticuerpo biotinilado. 25 Entonces, se añade el segundo reactivo en perlas y se une a la biotina para formar inmunocomplejos de pares de perlas. Cuando se ilumina mediante luz a 680 nm, el segundo reactivo en perlas convierte el oxígeno disuelto en la disolución de reacción en la forma de oxígeno singlete más energética (1O_2). En los pares de perlas, el oxígeno singlete difunde en el primer reactivo en perlas activando de ese modo una reacción quimioluminiscente. Se mide la señal quimioluminiscente resultante a 612 nm y es una función inversa de la concentración de rapamicina en la muestra. La cantidad de esta señal está relacionada con la presencia de la cantidad de rapamicina en la muestra.

30 Un ejemplo específico de otro formato de ensayo es ACMIA (inmunoensayo mediado por columnas de afinidad). Para el formato de ensayo ACMIA, se emplean partículas de cromo, que están recubiertas con rapamicina o un análogo de rapamicina, como primer componente. Un segundo componente es un anticuerpo para rapamicina. Este anticuerpo se reticula a una enzima indicadora (habitualmente beta-galactosidasa) y se añade a un vaso de reacción en exceso. Se mezcla el conjugado de anticuerpo-enzima con una muestra para permitir que el analito se una al anticuerpo. A continuación, se añade el reactivo de cromo para unir cualquier cantidad de conjugado de anticuerpo-enzima en exceso. Entonces, se aplica un imán, que arrastra todo el cromo y el anticuerpo-enzima en exceso fuera de la suspensión, y se transfiere el sobrenadante a un recipiente de reacción final. Se añade el sustrato de la enzima indicadora al recipiente de reacción final, y se mide la actividad enzimática de manera 35 espectrofotométrica como un cambio en la absorbancia con el tiempo. Al menos uno del anticuerpo para rapamicina como parte del segundo componente o la rapamicina en las partículas de cromo es según las realizaciones de la invención tratadas anteriormente. La cantidad de esta señal está relacionada con la presencia de la cantidad de rapamicina en la muestra.

40 En un formato de tipo *sándwich*, se emplean un primer reactivo que comprende partículas de cromo recubiertas con anticuerpos anti-rapamicina (o proteína de unión a rapamicina), y un segundo reactivo que comprende un segundo anticuerpo (o proteína de unión) conjugado a una enzima indicadora. En este formato, se incuba la muestra con las partículas de cromo de modo que toda la rapamicina en la muestra se une a las partículas de cromo. Se lavan las partículas de cromo, usando un imán para separar el analito unido del sobrenadante. Entonces, se incuba el segundo reactivo, es decir, el anticuerpo (o proteína de unión) conjugado a una enzima 45 indicadora, con las partículas de cromo para formar un "*sándwich*". Tras lavado, se mide la cantidad de enzima que se une al cromo y que está relacionada con la presencia y/o la cantidad de rapamicina en la muestra. Al menos uno

de los anticuerpos de los reactivos de anticuerpos primero y segundo es según las realizaciones de la invención tratadas anteriormente.

Otro formato de ensayo es EMIT (tecnología de inmunoensayos mediados por enzimas). En este formato de ensayo, se forma un conjugado enzimático tal como, por ejemplo, un conjugado de G-6-PDH y rapamicina. Se incuba un anticuerpo para rapamicina con el conjugado enzimático y una muestra de la que se sospecha que contiene rapamicina. El anticuerpo para rapamicina se une al analito de rapamicina en la muestra en lugar de unirse al conjugado enzimático, lo que reduce la cantidad de inhibición de la actividad enzimática que puede producirse de otra manera en ausencia de rapamicina en la muestra. De esta manera, las muestras con más analito producirán una actividad enzimática superior, y las muestras sin analito tendrán la máxima inhibición y la menor actividad enzimática. La cantidad de reducción de la inhibición de la actividad enzimática está relacionada con la cantidad de rapamicina en la muestra. Al menos uno del anticuerpo para rapamicina o la rapamicina del conjugado de rapamicina-enzima es según las realizaciones de la invención tratadas anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a kits útiles para realizar de manera conveniente un ensayo para la determinación de un compuesto de sirolimus. En una realización, un kit comprende en combinación envasada, un anticuerpo para un compuesto de sirolimus y un conjugado enzimático según las realizaciones de la invención. En otra realización, un kit de la invención comprende en combinación envasada, un conjugado de una enzima y un compuesto de sirolimus, un anticuerpo para un compuesto de sirolimus producido contra un conjugado de un compuesto de sirolimus y un portador inmunogénico según las realizaciones de la invención. También se incluyen otras realizaciones del kit y los reactivos en el kit dependen del formato de ensayo particular. Sin embargo, al menos uno de los reactivos comprende un anticuerpo producido contra un inmunógeno según las realizaciones de la presente invención o comprende un conjugado marcador según las realizaciones de la presente invención o ambos.

Para potenciar la versatilidad de la invención objeto, pueden proporcionarse los reactivos del kit en combinación envasada, en recipientes iguales o separados, en forma líquida o liofilizada de modo que la razón de los reactivos proporcione la optimización sustancial del método y el ensayo. Los reactivos, cada uno, puede estar en recipientes separados o pueden combinarse diversos reactivos en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos.

El kit puede incluir además otros reactivos envasados de manera separada para llevar a cabo un ensayo tal como los elementos sbp adicionales, reactivos auxiliares tales como un sustrato enzimático auxiliar, etcétera. Pueden variarse ampliamente las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que es necesario que se produzcan durante el presente método y además optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, pueden proporcionarse uno o más de los reactivos en el kit como polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes, que con su disolución proporcionarán una disolución del reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo según la presente invención. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método según la presente invención tal como se describió anteriormente.

Realizaciones específicas

Los ejemplos de realizaciones específicas de la invención incluyen las siguientes.

Un compuesto que comprende un resto, seleccionado del grupo que consiste en restos de marcador de poli(aminoácido), restos de marcador que no son de poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de poli(aminoácido), portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido), restos de poli(aminoácido) que no son marcadores y restos de poli(aminoácidos) portadores que no son inmunogénicos unidos a un compuesto de sirolimus en la posición 26.

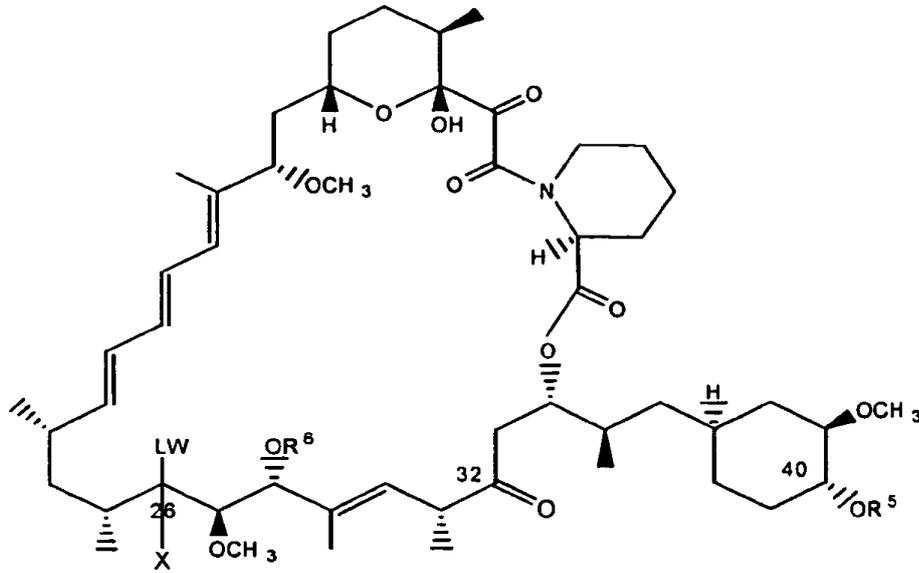
Un compuesto según lo anterior en el que el resto está unido al compuesto de sirolimus en la posición 26 mediante un grupo conector.

Un compuesto según lo anterior en el que el grupo conector comprende una funcionalidad oxima.

Un compuesto según lo anterior en el que el resto es un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas o un portador inmunogénico de poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en albúminas y globulinas.

Un compuesto según lo anterior en el que el resto es un marcador de poli(aminoácido) que es una enzima o un resto de marcador que no es de poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en polinucleótidos que codifican para un catalizador, promotores, colorantes, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, coenzimas, sustratos enzimáticos, grupos reactivos, moléculas orgánicas pequeñas, secuencias de polinucleótido amplificables, y partículas.

Un compuesto según lo anterior de la estructura:

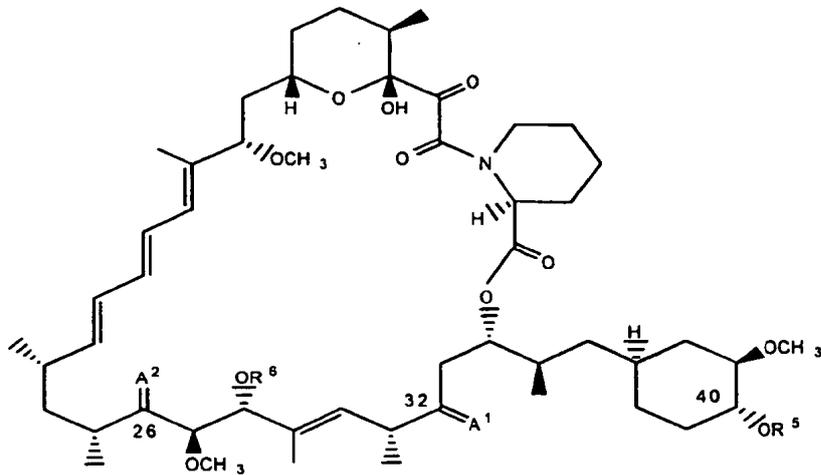


en la que L es un grupo conector, X es hidrógeno, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆, y W es un resto, seleccionado del grupo que consiste en poli(aminoácidos), restos de marcador que no son de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido).

5 Un anticuerpo producido contra un compuesto según lo anterior en el que el resto es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) unido en la posición 26.

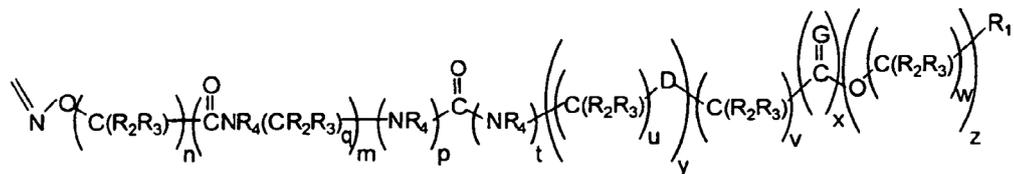
Un compuesto según lo anterior en el que el compuesto de sirolimus es rapamicina o un derivado de la misma.

10 Un compuesto de estructura I:



I

en la que A¹ es oxo y A² es un grupo de fórmula:



Ia

en la que:

n, q, u, v y w son independientemente de 0 a aproximadamente 12,

m es 0 ó 1,

p es 0 ó 1,

5 t es 0 ó 1,

y es de 0 a aproximadamente 5,

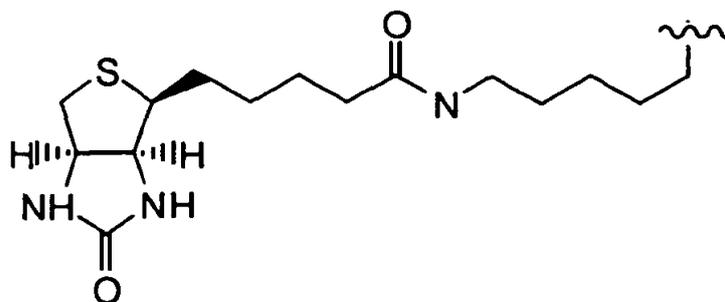
x es 0 ó 1,

z es 0 ó 1,

D es O o S,

10 G es O o NR²,

R¹ es un resto, seleccionado del grupo que consiste en grupos funcionales, restos de marcador de poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de poli(aminoácido), restos de marcador que no son de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido), o



II

15 R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, bencilo, OH, halógeno, alcoxilo C₁₋₆; alquenilo C₃₋₁₀, y alquinilo C₃₋₁₀,

R⁴ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, bencilo, alquenilo C₃₋₁₀, alquinilo C₃₋₁₀; y

20 R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno; fenilo; fenilo sustituido en el que los sustituyentes son X, Y y Z; 1- o 2-naftilo; 1- o 2-naftilo sustituido en el que los sustituyentes son X, Y y Z; C(O)alquilo C₁₋₆; alquilo C₁₋₁₀; cicloalquilo C_{3-C10}; alquilo C₁₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆; fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆; alquenilo C₃₋₁₀; cicloalquenilo C₄₋₁₀; alquenilo C₃₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆, fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆; alquinilo C₃₋₁₀; y alquinilo C₃₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆, fenilo, fenilo sustituido, en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆;

30 X, Y y Z se seleccionan independientemente de: hidrógeno; alquilo C₁₋₇; alquenilo C₂₋₆; halógeno; CN; C(O)H; grupos perhalosustituidos; SR⁷, en el que R⁷ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, CF₃ o fenilo; SOR⁷, en el que R⁷ es tal como se definió anteriormente; SO₂R⁷, en el que R⁷ es tal como se definió anteriormente; CONR⁵R⁶, en el que R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente; -(CH₂)_rOR⁸, en el que R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃; hidroxi-alquilo C₂₋₃, y r es 0-2; alquilo C₁₋₃; hidroxi-alquilo C₂₋₃; CH(OR⁹)(OR¹⁰), en el que R⁹ y R¹⁰ son alquilo C₁₋₃ o tomados juntos forman un puente de etilo o propilo; -(CH₂)_rOC(O)R⁸, en el que R⁸ y r son tal como se definieron anteriormente, y -(CH₂)_rC(O)OR⁸, en el que R⁸ y r son tal como se definieron anteriormente.

Un compuesto según lo anterior en el que m es 0 y p es 1.

35 Un compuesto según lo anterior en el que m es 1 y p es 1.

Un compuesto según lo anterior en el que m y p son cada uno 0.

Un compuesto según lo anterior en el que el resto es un portador inmunogénico seleccionado del grupo que consiste en poli(aminoácidos), polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas.

Un compuesto según lo anterior en el que el resto es un marcador seleccionado del grupo que consiste en enzimas, polinucleótidos que codifican para un catalizador, promotores, colorantes, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, coenzimas, sustratos enzimáticos, grupos reactivos, moléculas orgánicas pequeñas, secuencias de polinucleótido amplificables y partículas.

5 Un compuesto según lo anterior en el que R² y R³ y R⁴ son hidrógeno, R⁵ y R⁶ son independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆ y A¹ es oxo.

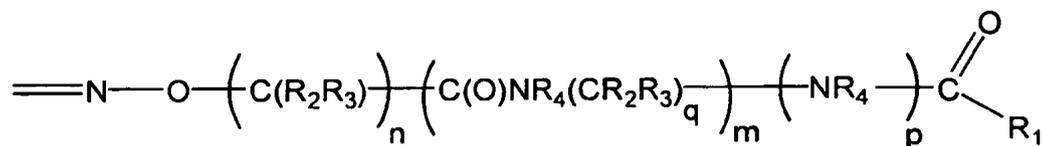
Un compuesto según lo anterior en el que R² y R³ y R⁴ son hidrógeno, R⁵ y R⁶ son independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆ y A¹ es oxo.

10 Un compuesto según lo anterior en el que R² y R³ y R⁴ son hidrógeno, R⁵ y R⁶ son independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₇ o C(O)alquilo C₁₋₆ y A¹ es oxo.

Un compuesto según lo anterior en el que el resto es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en albúmina sérica bovina, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina de huevo y gammaglobulina bovina.

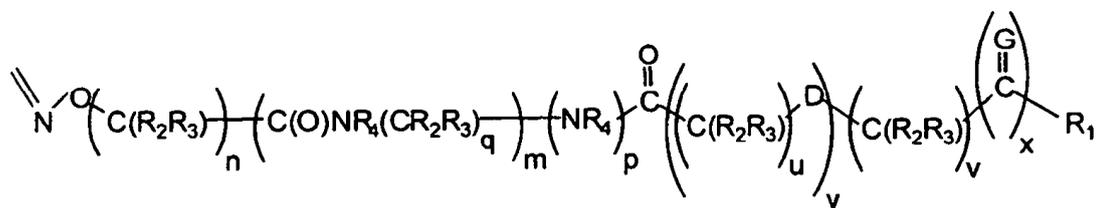
15 Un compuesto según lo anterior en el que el resto es un resto de marcador de poli(aminoácido) que es una enzima.

Un compuesto según lo anterior en el que el grupo la tiene la fórmula:



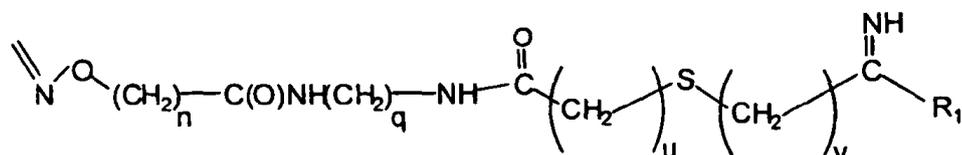
Ib

Un compuesto según lo anterior en el que el grupo la tiene la fórmula:



Ic

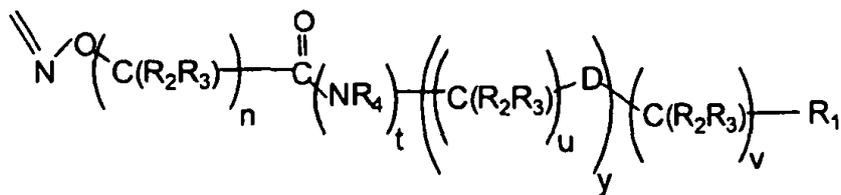
20 Un compuesto según lo anterior en el que el grupo la tiene la fórmula:



Ic'

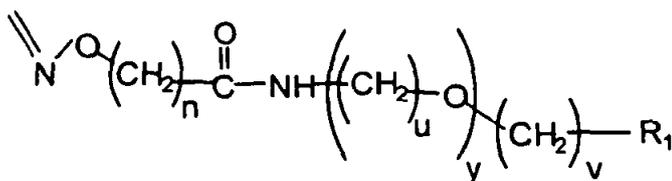
incluyendo sales de imina de los mismos.

Un compuesto según lo anterior en el que el grupo la tiene la fórmula:



Id

Un compuesto según lo anterior en el que el grupo la tiene la fórmula:



Id'

en la que n es 1, u es 2, y es 2 y v es 1 y en la que R¹ se une a través de un resto amina de R¹.

- 5 Un anticuerpo producido contra un compuesto según lo anterior en el que el resto es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) en la posición 26.
- Un kit que comprende un anticuerpo según lo anterior y un conjugado de un compuesto de sirolimus y un marcador.
- 10 Un kit que comprende un anticuerpo según lo anterior y un conjugado de un compuesto de sirolimus y un marcador.
- Un kit que comprende un anticuerpo para un compuesto de sirolimus y un compuesto según lo anterior en el que el resto es un marcador de poli(aminoácido) o un marcador que no es de poli(aminoácido).
- Un kit según lo anterior en el que el resto es un marcador que no es de poli(aminoácido) que es una partícula de cromo.
- 15 Un kit según lo anterior en el que el resto es un marcador de poli(aminoácido) que es una enzima.
- Un kit según lo anterior en el que la enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- Un método para determinar un compuesto de sirolimus en una muestra de la que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar en combinación en un medio:
- 20 (i) la muestra,
- (ii) un anticuerpo para el compuesto de sirolimus, y
- (iii) un compuesto según lo anterior en el que el resto es un marcador de poli(aminoácido) o un marcador que no es de poli(aminoácido), y
- 25 (b) examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el compuesto de sirolimus y el anticuerpo para sirolimus, indicando la presencia del mismo la presencia del compuesto de sirolimus en la muestra.
- Un método para determinar un compuesto de sirolimus en una muestra de la que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar en combinación en un medio:
- 30 (i) la muestra,
- (ii) un anticuerpo según lo anterior, y

(iii) un conjugado de marcador de compuesto de sirolimus, y

(b) examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el compuesto de sirolimus y el anticuerpo para sirolimus, indicando la presencia del mismo la presencia del compuesto de sirolimus en la muestra.

5 Un método para determinar un compuesto de sirolimus en una muestra de la que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus, comprendiendo el método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) la muestra,

(ii) un anticuerpo según lo anterior, y

10 (iii) un conjugado de marcador de compuesto de sirolimus, y

(b) examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el compuesto de sirolimus y el anticuerpo para sirolimus, indicando la presencia del mismo la presencia del compuesto de sirolimus en la muestra.

15 Un compuesto de sirolimus según lo anterior en el que el compuesto de sirolimus de estructura I está unido a un polisacárido por medio de la y en el que el polisacárido está unido además a una partícula.

Un compuesto de sirolimus según lo anterior en el que la partícula es una partícula de cromo.

Un método homogéneo para determinar la presencia o la cantidad de un compuesto de sirolimus en un medio del que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus, comprendiendo el método:

20 a) proporcionar en combinación (1) un medio del que se sospecha que contiene el compuesto de sirolimus, (2) un fotosensibilizador asociado con una primera partícula y que puede generar oxígeno singlete, y (3) una composición quimioluminiscente que puede activarse mediante oxígeno singlete y asociarse con una segunda partícula, en el que un anticuerpo según lo anterior se asocia con la primera partícula o la segunda partícula o ambas,

25 b) someter la combinación a condiciones para la unión del anticuerpo al compuesto de sirolimus, si está presente, y

c) irradiar el fotosensibilizador con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente, estando relacionada la cantidad de la misma con la cantidad de cada uno de los componentes en el medio.

30 Un método según lo anterior en el que el anticuerpo se asocia con la primera partícula en virtud de estar unida a una molécula pequeña y la partícula comprende una pareja de unión para la molécula pequeña.

Un método según lo anterior en el que la molécula pequeña es biotina y la pareja de unión es estreptavidina.

Un método según lo anterior en el que la segunda partícula se recubre con un análogo de rapamicina.

35 Un método homogéneo para determinar la presencia o la cantidad de un compuesto de sirolimus en un medio del que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus, comprendiendo el método:

40 a) proporcionar en combinación (1) un medio del que se sospecha que contiene el compuesto de sirolimus, (2) un fotosensibilizador asociado con una primera partícula y que puede generar oxígeno singlete, y (3) una composición quimioluminiscente que puede activarse mediante oxígeno singlete y asociarse con una segunda partícula, en el que un anticuerpo según lo anterior se asocia con la primera partícula o la segunda partícula o ambas,

b) someter la combinación a condiciones para la unión del anticuerpo al compuesto de sirolimus, si está presente, y

45 c) irradiar el fotosensibilizador con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente, estando relacionada la cantidad de la misma con la cantidad de cada uno de los componentes en el medio.

Un método según lo anterior en el que el anticuerpo se asocia con la primera partícula en virtud de estar unida a una molécula pequeña y la partícula comprende una pareja de unión para la molécula pequeña.

Un método según lo anterior en el que la molécula pequeña es biotina y la pareja de unión es estreptavidina.

Un método según lo anterior en el que la segunda partícula se recubre con un análogo de rapamicina.

5 Un método homogéneo para determinar la presencia o la cantidad de un compuesto de sirolimus en un medio del que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus, comprendiendo el método:

10 a) proporcionar en combinación (1) un medio del que se sospecha que contiene el compuesto de sirolimus, (2) un fotosensibilizador asociado con una primera partícula y que puede generar oxígeno singlete, y (3) una composición quimioluminiscente que puede activarse mediante oxígeno singlete y asociarse con una segunda partícula, en el que un anticuerpo para el compuesto de sirolimus se asocia con la primera partícula o la segunda partícula o ambas y en el que la otra de la primera partícula o la segunda partícula se recubre con un compuesto de sirolimus de lo anterior,

b) someter la combinación a condiciones para la unión del anticuerpo al compuesto de sirolimus, si está presente, y

15 c) irradiar el fotosensibilizador con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente, estando relacionada la cantidad de la misma con la cantidad de cada uno de los componentes en el medio.

Un método según lo anterior en el que el anticuerpo se asocia con la primera partícula en virtud de estar unida a una molécula pequeña y la partícula comprende una pareja de unión para la molécula pequeña.

20 Un método según lo anterior en el que la molécula pequeña es biotina y la pareja de unión es estreptavidina.

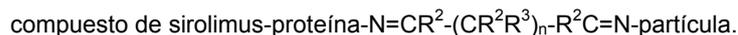
Un método según lo anterior en el que la segunda partícula se recubre con un compuesto de sirolimus.

Un compuesto de sirolimus que comprende una partícula unida al compuesto de sirolimus por medio de un grupo conector de fórmula:



25 en la que R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, bencilo, OH, halógeno, alcoxilo C₁₋₆; alquenilo C₃₋₁₀ y alquinilo C₃₋₁₀.

Un compuesto de sirolimus según lo anterior que tiene la fórmula general:



Un compuesto de sirolimus según lo anterior en el que la partícula es una partícula de cromo.

30 Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación y pretenden describir y no limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

35 La cromatografía de capa fina (CCF, sílice) analítica es el método de análisis usual y se realizó usando placas de Analtech, Newark DE (n.º de catálogo: VWRDU, ranuradas de 10x20 cm, 250 μm). Las separaciones de cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) se llevaron a cabo en placas de gel de sílice recubiertas previamente de Whatman, Clifton NJ (n.º de catálogo: 4856-840, gel de sílice, 150 Å⁰, 1000 μm) y Analtech (n.º de catálogo: 02015, gel de sílice, 2000 μm). Los reactivos y disolventes eran de calidad comercial y se usaron sin purificación adicional. Se obtuvo la rapamicina de BioAge Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA. Se obtuvieron los reactivos ensayo de proteínas KLH, BSA y BCA de Pierce Chemical Company, St. Louis MO. Se registraron rutinariamente los espectros de ¹H-RMN en un espectrómetro Bruker Ultrashiel™-400 (400 MHz) (Bruker Instruments, Bellerica, MA 01821). Se notificaron los desplazamientos químicos en partes por millón (ppm, δ); se usaron tetrametilsilano (TMS) u otros disolventes deuterados como las referencias internas. Se obtuvieron los espectros de masas desde el Laboratorio de Espectrometría de Masas, Universidad de California en Berkeley, California.

Preparación de compuestos (2) y (3) (véase la figura 1)

45 A una disolución de rapamicina (1) (1 g, 1,0545 mmol) y hemiclrorhidrato de carboximetiloxilamina (823 mg, 3,16 mmol) en metanol (MeOH) (41 ml), se le añadió acetato de sodio (263,0 mg, 3,18 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche y se monitorizó el avance de la reacción mediante CCF (gel de sílice) (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9). Se añadieron a la mezcla agua desionizada (40 ml) y cloruro de metileno (40 ml). Se extrajo una fase acuosa con cloruro de metileno (3 x 40 ml), entonces se lavó la fase orgánica combinada con agua desionizada (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. Esto dio un

producto bruto (1,0774 g). Se realizó la purificación del producto bruto (148,8 mg) con tres placas de CCF preparativas (gel de sílice, 150 Å, 1000 µm, Whatman) (acetato de etilo (EtOAc)/hexano/MeOH) = 5/2/1 con una adición de ácido acético glacial) para dar dos compuestos (2) (32,6 mg, rendimiento del 45%) y (3) (39,4 mg, 55%). (2): espectro de masas (FAB; m/e: MNa^+ , 1171,6); (3): espectro de masas (FAB; m/e: MNa^+ , 1171,6).

5 Preparación de inmunógeno de KLH (4) (véase la figura 2)

A una disolución de (2) (70,1 mg, 0,071 mmol) en THF/DMF (6 ml de THF, 0,1 ml de DMF) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS) (12,8 mg, 0,108 mmol) y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (22,2 mg, 0,106 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno y el producto éster de rapamicina (Rapa)-NHS es una mancha menos polar que el compuesto (2). La reacción no finalizó en seis horas, de modo que se añadieron otro lote de N-hidroxisuccinimida (NHS) (16,85 mg, 0,142 mmol) y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (29,59 mg, 0,142 mmol) en la mezcla de reacción y la reacción finalizó en 16 horas. Se filtró el sólido blanco formado durante la reacción y luego se lavó con EtOAc. Tras eliminarse el disolvente, se redisolvió la mezcla de reacción en EtOAc y se filtró; la evaporación del disolvente proporcionó un líquido ligeramente amarillo, que se mantuvo a alto vacío durante una hora.

Se disolvió el hapteno activado de éster de Rapa-NHS en dimetilformamida (DMF) (2 ml) y se añadió gota a gota a una KLH (100 mg, 0,0362 mmol de NH_2) en tampón PBS (NaH_2PO_4 0,1 M/ Na_2HPO_4 , pH 8) (30 ml) en un baño de hielo. Tras agitar durante una hora a temperatura ambiente, se ajustó el pH de la disolución a 8 con NaOH (2 N) y se agitó la mezcla en una sala fría (4°C) durante la noche.

Se purificó el inmunógeno de rapamicina KLH usando una columna de SEPHADEX® G-25 (C26x100) equilibrada con tampón PBS (NaH_2PO_4 0,1 M/ Na_2HPO_4 , pH 7), eluida con el mismo tampón PBS. El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre el inmunógeno de KLH y el hapteno. Se reunieron se reunieron las fracciones que contenían inmunógeno de KLH (4) hasta un total de 75 ml, que luego se concentró mediante un concentrador Amica hasta 51 ml (Amica, modelo 8050, 50 ml de Millipore Corporation, Burlington MA). Se determinó la concentración del inmunógeno mediante el ensayo de concentración de proteína BCA y el ensayo del número de haptenos mediante ácido 2,4,6-trinitrobenenosulfónico (TNBS). El inmunógeno tenía una concentración de 1,60 mg/ml con un número de haptenos de 1072 y se usó para la inmunización de ovejas para producir anticuerpos.

Preparación de inmunógeno de BSA (5) (véase la figura 2)

A una disolución de (2) (167,97 mg, 0,17 mmol) en tetrahidrofurano (THF)/DMF (8 ml de THF, 0,4 ml de DMF) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS) (41,8 mg, 0,35 mmol), N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (70,9 mg, 0,34 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno y el producto éster de Rapa-NHS es una mancha menos polar que el compuesto (2). Se añadieron dos lotes más de NHS y DCC, un lote con NHS (30,3 mg, 0,26 mmol) y DCC (53,1 mg, 0,25 mmol, otro lote con NHS (20,2 mg, 0,17 mmol) y DCC (35,4 mg, 0,17 mmol) tras 4 horas y 20 horas de reacción, respectivamente. La reacción finalizó en 24 horas. Se filtró el sólido blanco formado durante la reacción y luego se lavó con EtOAc. Tras eliminarse el disolvente, se redisolvió la mezcla de reacción en EtOAc y se filtró; la evaporación del disolvente proporcionó un líquido ligeramente amarillo, que estuvo a alto vacío durante una hora.

Se disolvió el hapteno activado de éster de Rapa-NHS en DMF (1 ml) y se añadió gota a gota a una BSA (120 mg, 0,0896 mmol de NH_2) en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaH_2PO_4 0,1 M/ Na_2HPO_4 , pH 8) (14 ml) en un baño de hielo. Tras agitar durante una hora a temperatura ambiente, se ajustó el pH de la disolución a 8 con NaOH (1 N) y se agitó la mezcla en una sala fría (4°C) durante la noche.

Se purificó el inmunógeno de BSA rapamicina a través de una columna de SEPHADEX® G-25 (C26x70) equilibrada con tampón PBS (NaH_2PO_4 0,1 M/ Na_2HPO_4 , pH 7), eluida con el mismo tampón PBS. El detector UV a 280 nm controla las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre el inmunógeno de BSA y el hapteno. Se reunieron se reunieron las fracciones que contenían inmunógeno de BSA (5) hasta un total de 57 ml, se determinó la concentración del inmunógeno mediante el ensayo de concentración de proteína BCA y el número de haptenos mediante el ensayo de TNBS. El inmunógeno tenía una concentración de 2,52 mg/ml con un número de haptenos de 43 y se usó para la inmunización de ovejas para producir anticuerpos.

Preparación del compuesto (7) (véase la figura 3)

A un matraz de fondo redondo seco de 250 ml se le añadieron N-Boc-etilendiamina (6) (1,0 g, 6,116 mmol), CH_2Cl_2 (100 ml) y N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) (2,13 ml, 12,233 mmol). Se agitó la mezcla a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 10 minutos. Luego se añadió bromuro de bromoacetilo a través de una jeringa en 10 minutos en un baño de hielo. Se monitorizó el avance de la reacción mediante CCF (gel de sílice, MeOH/ CH_2Cl_2 = 1/9) y el producto era un compuesto menos polar que el bromuro de bromoacetilo. La reacción finalizó en una hora. Se lavó la mezcla con agua desionizada (2x20 ml). Se extrajeron las fases acuosas con CH_2Cl_2 (2x20 ml). Se secó la fase orgánica combinada sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando CH_2Cl_2 /MeOH = 97/3 como eluyente para dar el compuesto (7) producto

deseado (1,2290 g, rendimiento del 71%) como un sólido amarillo. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7,62 (sa, 1H), 5,59 (t, $J=5,68$ Hz, 1H), 3,88 (s, 2H), 3,41 (q, $J=5,64$ Hz, 2H), 3,31 (t, $J=5,44$ Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

Preparación del compuesto (8) (véase la figura 3)

5 A una disolución con agitación del compuesto (7) (1,229 g, 4,37 mmol) en EtOAc (60 ml)/MeOH (0,45 ml) en un baño de agua-hielo se le añadió bromuro de acetilo (484,8 μl , 6,557 mmol), en un minuto a través de una jeringa. Se agitó la mezcla a 0°C y se monitorizó el avance de la reacción mediante CCF (gel de sílice, MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 5/95$). Comenzó a formarse un sólido 5 minutos tras la adición del bromuro de acetilo. La CCF indicó que la reacción no finalizó tras 5 horas. Se añadió otro lote de bromuro de acetilo (323 μl , 4,37 mmol) a la mezcla y la reacción finalizó en 6 horas. Se decantó el disolvente y se añadieron 10 ml de EtOAc al matraz. Tras el mezclado y la sedimentación de los sólidos, se decantó el disolvente de nuevo. Se repitió el procedimiento hasta que el pH del disolvente fue de aproximadamente 5. Se eliminó una pequeña cantidad del disolvente mediante evaporación rotatoria, y se secó el resto mediante bombas de alto vacío durante la noche. El producto (8) era un sólido pardusco claro (1,208 g, rendimiento del 105,6%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3,92 (s, 2H), 3,51 (t, $J=6,06$ Hz, 2H), 3,10 (t, $J=5,94$ Hz, 2H).

15 Preparación de los compuestos (9) y (10) (véase la figura 4)

A una disolución de mezcla de regioisómeros de rapamicina-oxima (2) y (3) (100,8 mg, 0,102 mmol) en THF (3,5 ml) se le añadieron NHS (36,4 mg, 0,307 mmol) y DCC (63,9 mg, 0,307 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante seis horas. Se monitorizó el avance de la reacción mediante CCF (gel de sílice, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 1/19$) y el producto es un compuesto menos polar que el regioisómero inicial. Se filtró el sólido que se formó durante la reacción y se lavó con acetato de etilo. Tras la eliminación del disolvente, se disolvió el compuesto en acetato de etilo y se filtró; la concentración del producto proporcionó un sólido blanco (177,4 mg). A esta disolución de éster de Rapa-NHS en CH_2Cl_2 (3 ml), se le añadieron el compuesto (8) en CH_2Cl_2 y EtOAc (1 ml). Tras agitar durante 10 minutos, se añadió DIPEA y se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. Se añadió agua desionizada (15 ml) al matraz y se ajustó el pH de la disolución a entre 4 y 5 con HCl (0,1 N). Tras la separación en dos fases, se extrajo la fase acuosa con CH_2Cl_2 (225 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con agua desionizada (115 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . La evaporación del disolvente dio un sólido amarillo (172,3 mg), que fue sometido a CCF preparativa (gel de sílice, Analtech, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 19/1$) para dar una mezcla de productos (9) y (10) (65,5 mg, rendimiento del 55,8%). Adicionalmente, se sometió la mezcla de (9) y (10) (52,1 mg) a CCF preparativa (gel de sílice, Analtech, EtOAc/hexano/MeOH = 14/5/1) para dar dos fracciones (9) (17,4 mg, rendimiento aislado del 34%) y (10) (18,4 mg, rendimiento aislado del 35%). (9): espectro de masas (ES^+ ; MNa, m/e: 1171,6); (10): espectro de masas (ES, MNa^+ m/e: 1171,6).

Preparación de inmunógeno de KLH (13) (véase la figura 5)

(a) Preparación de KLH tiolado (11)

35 A KLH (40 mg) en una disolución tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,6) (8 ml) se le añadió clorhidrato de 2- iminotiolano (2-IT) (12,2 mg, 0,0886 mmol) en un baño de hielo. Se agitó la disolución a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante una hora. Se purificó la KLH tiolada (KLH-SH) a través de una columna de SEPHADEX® G-25 (C26x40) equilibrada y se eluyó con una disolución tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,2). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna usando un detector UV a 280 nm. Se reunieron las fracciones que contenían KLH (11) hasta un total de 17 ml y se determinó que la concentración de la proteína era de 3,29 mg/ml mediante un detector UV a 280 nm.

(b) Preparación de inmunógeno de KLH (13)

45 A la disolución KLH-SH (11) (4,74 ml) se le añadió (9) (12,5 mg, 10,9 mmol) en DMF (0,5 ml) gota a gota en un baño de hielo. Tras agitar a temperatura ambiente durante una hora, se mantuvo la disolución con agitación en una sala fría (4°C) durante la noche. Se purificó la mezcla de reacción a través de una columna de SEPHADEX® G-25 (C26x40), que se equilibró con un tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,0). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna usando un detector UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre el inmunógeno de KLH y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían inmunógeno de KLH (13) hasta un total de 12,5 ml. Se determinó la concentración del inmunógeno mediante el ensayo de concentración de proteína BCA y el número de haptenos mediante el ensayo de TNBS. El inmunógeno tenía una concentración de 0,74 mg/ml con un número de haptenos de 1564 y se usó para la inmunización de conejos para producir anticuerpos.

Preparación de inmunógeno de BSA (14) (véase la figura 5)

(a) Preparación de BSA tiolada (12)

55 A BSA (40 mg) en una disolución de tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,6) (8 ml) se le añadió clorhidrato de 2-iminotiolano (2-IT) (23,0 mg, 0,167 mmol) en un baño de hielo. Se agitó la disolución a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante una hora. Se purificó la BSA tiolada (BSA-SH) a través de una

columna de SEPHADEX® G-25 (C26x40) equilibrada, eluida con tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 150 mM, etilendiaminotetraacetato (EDTA) 1 mM, pH 7,2) para eliminar el 2-IT en exceso. Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna usando un detector UV a 280 nm. Se reunieron las fracciones que contenían BSA (12) hasta un total de 20,05 ml y se determinó que la concentración de la proteína era de 1,215 mg/ml mediante un detector UV a 280 nm.

(b) Preparación de inmunógeno de BSA (14)

A la disolución de BSA-SH (12) (9,74 ml) se le añadió (9) (19,3 mg, 0,0168 mmol) en DMF (0,6 ml) gota a gota en un baño de hielo. Tras agitar a temperatura ambiente durante una hora, se mantuvo la disolución con agitación en una sala fría (4°C) durante 16 horas. Se purificó la mezcla de reacción a través de una columna de SEPHADEX® G-25 (C26x40), que se equilibró con un tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,0). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna usando un detector UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre el inmunógeno de BSA y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían inmunógeno de BSA (14) hasta un total de 30,05 ml; se determinó la concentración del inmunógeno mediante el ensayo de concentración de proteína BCA y el número de haptenos mediante el ensayo de TNBS. El inmunógeno tenía una concentración de 0,556 mg/ml con un número de haptenos de 23 y se usó para la inmunización de conejos para producir anticuerpos.

Preparación de suspensión de rapamicina-IgG-cromo (15) y (16) (véase la figura 6)

A una mezcla de regioisómeros de rapamicina-oxima (compuestos 2 y 3 preparados tal como se describió anteriormente) (12,6 mg, 0,0128 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadieron clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (8,58 mg, 0,045 mmol) y NHS (4,40 mg, 0,038 mmol). Tras agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, se añadió la disolución a IgG (76,6 mg, 0,0005 mmol) en disolución de tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0) (7,67 ml). Se osciló la mezcla a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró hasta 3,0 ml y se purificó a través de una columna SEPHADEX® G-25 equilibrada en tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,0). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna usando un detector UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre el conjugado de IgG y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían el conjugado hasta un total de 14,8 ml, se ajustó la concentración (4,06 mg/ml) de la proteína, que se determinó mediante el ensayo de concentración de proteína BCA, a 2 mg/ml para conjugación adicional.

Se lavó el material de partida de partículas de cromo (CPRM) (preparada tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 4.661.408, 4.769.165 y 5.164.299) (10 ml, 5% de sólidos) con tampón fosfato de sodio (x3) mediante centrifugación, suspensión y se resuspendió hasta 10 ml. Se diluyó glutaraldehído (al 25%, 4 ml) hasta 10 ml con tampón fosfato sodio (NaH_2PO_4 10 mM, pH 7) y luego se añadió al cromo lavado. Se osciló la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas y luego se lavó con tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 10 mM, pH 7) (x3) mediante centrifugación, suspensión y se resuspendió hasta 10 ml. Se añadió la disolución de conjugado de IgG (10 ml) al cromo lavado y se osciló a temperatura ambiente durante la noche.

Tras la adición de gammaglobulina bovina (BGG) (al 30% en peso/vol., 8 ml) en disolución tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 10 mM, pH 7, 8 ml), se osciló el conjugado de IgG-cromo a 45°C durante 4 horas. Luego se añadió tampón glicina (2 M, 14 ml) y se osciló la suspensión a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente se lavó el conjugado de IgG-cromo con tampón fosfato de sodio (3 x 20 ml) mediante centrifugación, suspensión y se finalizó hasta el volumen original (10 ml, 5% de sólidos).

Preparación del derivado de rapamicina (17) (véase la figura 7)

A una disolución de rapamicina (17) (300 mg, 0,328 mmol) en piridina (5 ml) se le añadió anhídrido acético lentamente (2,5 ml, 26,4 mmol) a 0-5°C. Se agitó la mezcla de reacción a 0-5°C durante 2 horas. El exceso de anhídrido se descompuso añadiendo metanol (1 ml). Se vertió la mezcla de reacción en HCl 2 N (10 ml) enfriado con hielo. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 60 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con agua desionizada (2 x 30 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. Estos productos se pusieron a alto vacío durante 24 horas para dar una mezcla de regioisómeros (17). El análisis de HPLC-EM de la mezcla presentó dos picos separados con la misma masa molecular (MNa^+ , 1020,8)

Preparación de los derivados de rapamicina (18) y (19) (véase la figura 7)

A una disolución de 28,40-diacetil-rapamicina (17) (112 mg, 0,1222 mmol) y hemiclорhidrato de carboximetiloxiamina (136 mg, 0,622 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió acetato de sodio (40 mg, 0,4878 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 5 horas y se monitorizó el avance de la reacción mediante CCF (gel de sílice) ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1/9$). Se añadió agua desionizada (10 ml) a la mezcla. La mayoría del metanol se evaporó mediante evaporación rotatoria. Se extrajo la fase acuosa con cloruro de metileno (3 x 30 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con agua desionizada (2 x 30 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. Estos productos se pusieron a alto vacío durante 24 horas para dar una mezcla de regioisómeros (18) y (19) (120 mg). El análisis HPLC-EM de la mezcla presentó dos picos separados con la misma masa molecular (MNa^+ , 1093,59) indicando la aparición de 18 y 19.

Preparación de suspensión de diacetil-rapamicina-IgG-cromo (20) y (21) (véase la figura 8)

A una mezcla de diacetil-rapamicina-oxima (18) y (19) (19,9 mg, 0,0186 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadieron EDC (12,48 mg, 0,065 mmol) y NHS (6,41 mg, 0,056 mmol). Tras agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, se añadió la disolución a IgG (111,45 mg, 0,0007 mmol) en disolución tampón fosfato de sodio (NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0) (11 ml). Se osciló la mezcla a temperatura ambiente durante la noche, luego se concentró hasta 3,0 ml y se purificó sobre una columna SEPHADEX® G-25 equilibrada en tampón fosfato de sodio (NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,0). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna usando un detector UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre el conjugado de IgG y el hapteno. Se monitorizaron las fracciones que contenían el conjugado hasta un total de 32 ml; la concentración (3,07 mg/ml) de la proteína, que se determinó mediante el ensayo de concentración de proteína BCA y se ajustó a 2 mg/ml mediante conjugación adicional.

Se lavó el material de partida de partículas de cromo (CPRM) (10 ml, 5% de sólidos) con tampón fosfato de sodio (x3) mediante centrifugación, suspensión y se resuspendió hasta 10 ml. Se diluyó glutaraldehído (25%, 4 ml) hasta 10 ml con tampón fosfato de sodio (NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7) y luego se añadió al cromo lavado. Se osciló la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas, luego se lavó con tampón fosfato de sodio (NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7) (x3) mediante centrifugación, suspensión y se resuspendió hasta 10 ml. Se añadió la disolución de conjugado de IgG (10 ml) al cromo lavado y se osciló a temperatura ambiente durante la noche.

Tras la adición de BGG (30% en peso/vol, 8 ml) en disolución tampón fosfato de sodio (NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7, 8 ml), se osciló el conjugado de IgG-cromo a 45°C durante 4 horas. Luego se añadió tampón glicina (2 M, 14 ml) y se osciló la suspensión a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente se lavó el conjugado de IgG-cromo con tampón fosfato de sodio (3 x 10 ml) mediante centrifugación, suspensión y se finalizó hasta el volumen original para dar las suspensiones (20) y (21) (10 ml, 5% de sólidos).

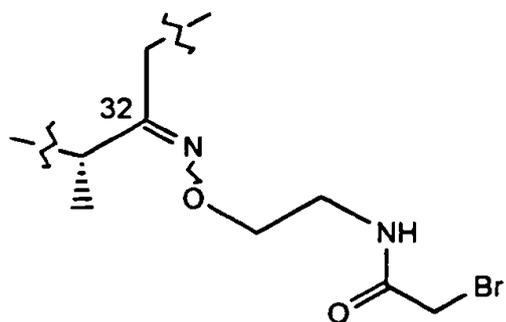
Preparación de suspensión de rapamicina-dexal-cromo (26) y (27) (véase la figura 9)

A una suspensión de partículas de dexal-cromo (preparada mediante un procedimiento similar al descrito en la patente estadounidense n.º 6.231.982) (20 ml) se le añadió NaCNBH₃ (113,6 mg, 1,8 mmol) y una disolución de 1,2-bis(2-aminoetoxietano) (DA-10) (0,5 g, 3,37 mmol) en tampón fosfato de sodio (20 ml, 100 mM, pH 6). Se osciló la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. Se lavó el dexal-DA-10-cromo con bicarbonato de sodio (4 x 50 ml), agua DI (4 x 50 ml) hasta que el valor de pH del agua es de 7,00. Luego se lavó el dexal-DA-10-cromo con tampón fosfato de sodio (100 mM, pH 7) (2 x 50 ml) y se resuspendió hasta 20 ml para la siguiente reacción.

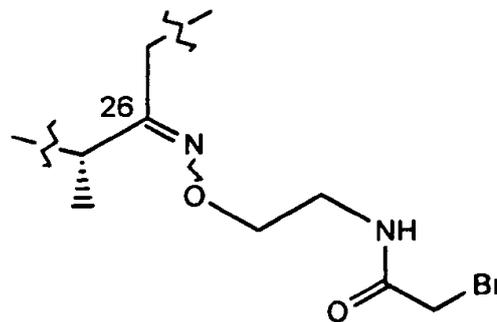
A una mezcla de rapamicina-oxima (2) y (3) (40 mg, 0,0405 mmol) en DMF (1 ml) se le añadieron EDC (25 mg, 0,13 mmol) y NHS (12 mg, 0,104 mmol). Tras agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, se añadió la disolución a la suspensión de dexal-DA-10-cromo en disolución tampón fosfato de sodio (8 ml, 100 mM, pH 7). Se osciló la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. Se lavó la suspensión de dexal-DA-10-rapamicina-cromo (26) y (27) con agua DI (4 x 50 ml), etanol (12 x 30 ml) y tampón fosfato de sodio (100 mM, pH 7) (4 x 50 ml) y se resuspendió hasta 7,5 ml (5% de sólidos).

Preparación de rapamicina-O-(conector de 6 átomos)-oxima 31 y 32.

Se añadieron rapamicina (79,6 mg, 87, µmol) disuelta en 1 ml de MeOH y N-(2-aminoxietil)-2-bromoacetamida (300 µmol) disuelta en 1,5 ml de MeOH, por medio de una jeringa seguido de NaOAc anhidro (23,4 mg, 285 µmol). Se agitó la mezcla durante 16 horas a 22°C y se concentró hasta sequedad a presión reducida. Se sometió el residuo a CCF preparativa (SiO₂, EtOAc-hexano, 5:2) para dar dos fracciones 1 (44 mg, 46%) y 2 (20 mg, 21%) como sólidos blancos junto con 18 mg (23%) de rapamicina realslada. Espectro de masas, (1, FAB-NBA), m/e 1000,9 (MNa⁺, 60). Espectro de masas (2, FAB-NBA), m/e 1000,9 (MNa⁺, 80). Las representaciones en los ejemplos a continuación muestran una parte de la totalidad de la molécula de rapamicina. Por ejemplo, inmediatamente a continuación está la rapamicina con el conector en la posición 32 (compuesto 31) y la posición 26 (compuesto 32).


 $R^5, R^6 = H$

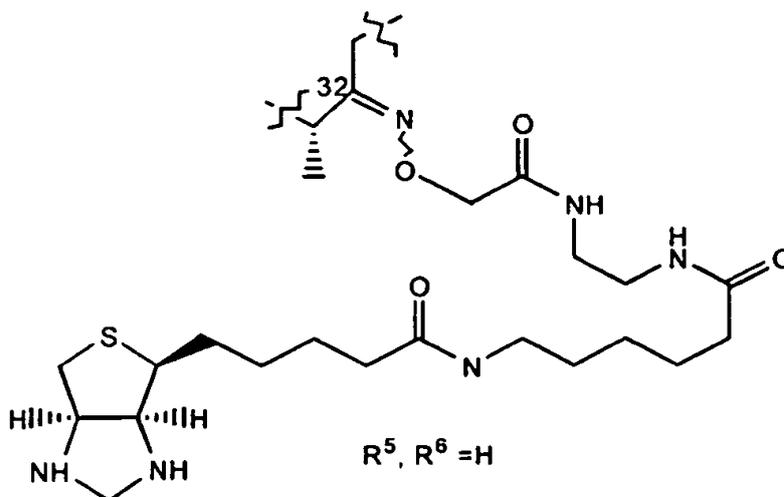
31


 $R^5, R^6 = H$

32

Preparación de biotina-CMO-rapamicina 35.

Se disolvió biotina (10 mg, 25,1 μmol) en 0,3 ml de DMF. Se añadieron el compuesto 3 (24,7 mg, 25,1 μmol) seguido de N-Hidroxisuccinimida (3,0 mg, 25,1 μmol) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (9,6 mg, 50,2 μmol) a la disolución de biotina-DMF a 0°C. Se agitó la mezcla durante 1 hora a 0°C, luego durante 3 horas a 22°C. Se aplicó la mezcla a una placa de CCF preparativa (SiO_2 , 1000 μm , EtOAc-MeOH, 8:1). La fracción mayoritaria de 35 se aísla como un polvo blanco y ha demostrado ser el producto deseado.


 $R^5, R^6 = H$

35

Preparación de conjugado de G6PDH-rapamicina-O-(conector de 9 átomos)-oxima (36) (figura 10)

Se intercambió el tampón de G6PDH (2,2 ml, 10 mg/ml, Genemed Biotechnologies, Inc., (South San Francisco CA) en una Amica (YM 8050) con tampón PBS (NaH_2PO_4 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,25) (3x50 ml), luego se midió la concentración de la enzima mediante la absorbancia a 280 nm y se ajustó a 5,0 mg/ml (6,91 ml) con la misma disolución tampón. Se añadió ditioneitol (DTT) (500 mM, 69,1 μl) a la disolución de enzima y se puso la mezcla en una nevera durante la noche. Se eliminó el DTT en exceso mediante un aparato Amica (YM 8050) a través de intercambio de tampón (NaH_2PO_4 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 25 μM , pH 7,25) intercambiado. Se midió la concentración de la proteína purificada mediante la absorbancia a 280 nm (6,8 mg/ml, 3,5 ml) y se ajustó a 3 mg/ml (7,9 ml) con tampón PBS (NaH_2PO_4 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 25 μM , pH 7,25). Se añadió rapamicina-O-(conector de 9 átomos)-oxima (9/10) (6,21 mg) en DMF (0,2 ml) a la enzima purificada anteriormente (2,63 ml, 3 mg/ml) y se osciló la disolución en una sala fría (4°C) durante 16 horas. Se monitorizó el avance de la reacción mediante la desaparición del tiol libre (-SH) usando 2,2'-ditiopiridina (DTDP). Se purificó el conjugado de G6PDH mediante una columna (Sephadex® G-25) equilibrada previamente eluida con tampón fosfato de sodio (NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,0). La purificación se corrió en una sala fría y se reunieron las fracciones que contenían conjugado enzimático (8,1 mg) y se encontró que la concentración del conjugado era de 1,33 mg/ml mediante la absorbancia a 280 nm. Se midió la

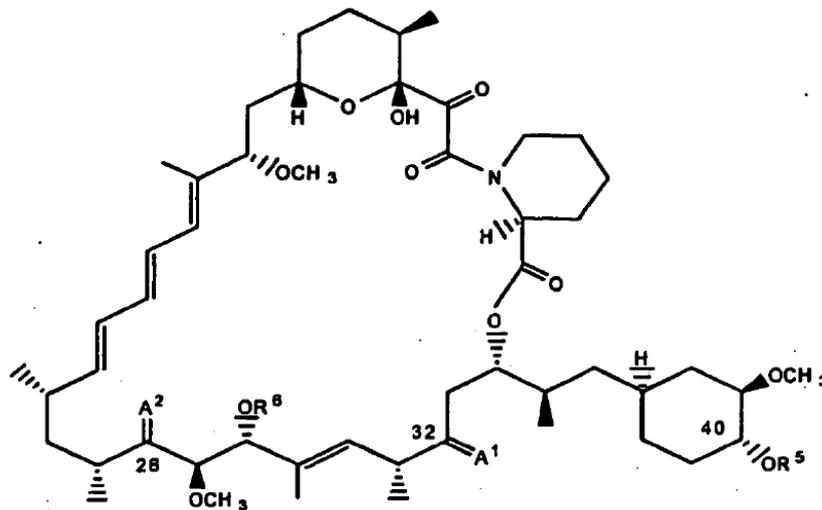
actividad enzimática del conjugado mediante el cambio en la absorbancia a 340 nm en de frente a la enzima nativa G6PDH y se encontró que era del 93,6%.

Ensayo EMIT usando anticuerpos policlonales de conejo producidos contra un inmunógeno de C-26-rapamicina-oxima preparado de manera similar a como se describió anteriormente:

- 5 Se generó un conjugado enzimático reticulando una mezcla de haptenos de rapamicina-oxima C-26 y C-32 a glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en un procedimiento similar al que se describió anteriormente. Se diluyó el conjugado en un tampón de dilución EMIT convencional para producir una velocidad de actividad enzimática máxima de 0,486 unidades de absorbancia por minuto o 486 mUA por minuto tal como se midió en el analizador Cobas MIRA S (Roche Diagnostics Systems, Inc., Branchburg, Nueva Jersey). Se diluyó 1:10 el suero del conejo n.º 1514
- 10 (al que se le inyectó el inmunógeno según procedimientos conocidos para la producción de anticuerpos policlonales) con el diluyente para anticuerpos EMIT convencional que contiene los cofactores necesarios para la actividad de G6PDH. Cuando se incubó este anticuerpo con el conjugado en ausencia de cualquier cantidad de rapamicina en la muestra, se redujo la velocidad de actividad enzimática a 329 mUA/min, lo que es una inhibición del 32,30%.
- 15 Cuando añadió la cantidad conocida de 200 ng/ml de rapamicina a la muestra, aumentó la velocidad de actividad enzimática a 354 mUA/min., lo que es una inhibición del 26,40%. Este cambio en la inhibición de desde el 32,30% hasta el 26,40% es una diferencia significativa y demuestra la eficacia del conjugado enzimático y los anticuerpos policlonales anteriores para técnicas de ensayo EMIT.

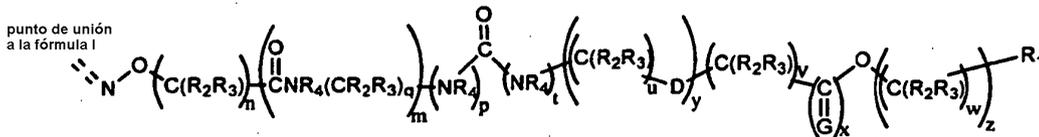
REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende un resto, seleccionado del grupo que consiste en restos de marcador de poli(aminoácido), restos de marcador que no son de poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de poli(aminoácido), portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido), restos de poli(aminoácido) que no son marcadores y restos de poli(aminoácidos) portadores que no son inmunogénicos unidos a un compuesto de sirolimus en la posición 26.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el resto está unido al compuesto de sirolimus en la posición 26 mediante un grupo conector que comprende una funcionalidad oxima.
3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el resto es un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas o un portador inmunogénico de poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en albúminas y globulinas.
4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el resto es un marcador de poli(aminoácido) que es una enzima o un resto de marcador que no es de poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en polinucleótidos que codifican para un catalizador, promotores, colorantes, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, coenzimas, sustratos enzimáticos, grupos reactivos, moléculas orgánicas pequeñas, secuencias de polinucleótido amplificables y partículas.
5. Compuesto según la reivindicación 1, 3 ó 4, en el que el compuesto de sirolimus es un compuesto de estructura I:



I

20 en la que A¹ es oxo y A² es un grupo de fórmula:



Ia

en la que:

n, q, u, v y w son independientemente de 0 a 12,

m es 0 ó 1,

p es 0 ó 1,

t es 0 ó 1,

25

y es de 0 a 5,

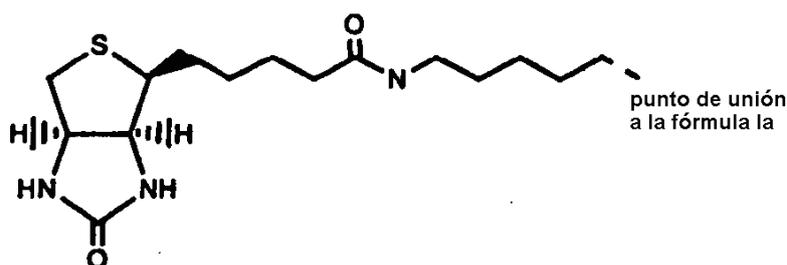
x es 0 ó 1,

z es 0 ó 1,

D es O o S,

5 G es O o NR²,

R¹ es un resto, seleccionado del grupo que consiste en grupos funcionales, restos de marcador de poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de poli(aminoácido), restos de marcador que no son de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos que no son de poli(aminoácido), o



II

10 R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, bencilo, OH, halógeno, alcoxilo C₁₋₆; alquenilo C₃₋₁₀ y alquinilo C₃₋₁₀,

R⁴ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₁₀, bencilo, alquenilo C₃₋₁₀, alquinilo C₃₋₁₀; y

15 R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno; fenilo; fenilo sustituido en el que los sustituyentes son X, Y y Z; 1- o 2-naftilo; 1- o 2-naftilo sustituido en el que los sustituyentes son X, Y y Z; C(O)alquilo C₁₋₆; alquilo C₁₋₁₀; cicloalquilo C₃₋₁₀; alquilo C₁₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆; fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆; alquenilo C₃₋₁₀; cicloalquenilo C₄₋₁₀; alquenilo C₃₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆, fenilo, fenilo sustituido en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆; alquinilo C₃₋₁₀; y alquinilo C₃₋₁₀ sustituido en el que uno o más sustituyente(s) se selecciona(n) de hidroxilo, oxo, alcoxilo C₁₋₆, fenilo, fenilo sustituido, en el que los sustituyentes en el fenilo son X, Y y Z y OC(O)alquilo C₁₋₆;

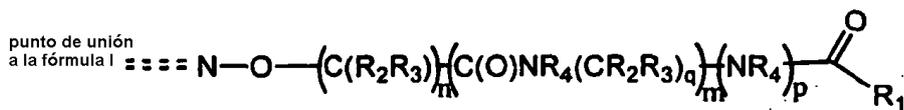
25 X, Y y Z se seleccionan independientemente de: hidrógeno; alquilo C₁₋₇; alquenilo C₂₋₆; halógeno; CN; C(O)H; grupos perhalosustituidos; SR⁷, en el que R⁷ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, CF₃ o fenilo; SOR⁷, en el que R⁷ es tal como se definió anteriormente; SO₂R⁷, en el que R⁷ es tal como se definió anteriormente; CONR⁵R⁶, en el que R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente; -(CH₂)_rOR⁸, en el que R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃; hidroxi-alquilo C₂₋₃, y r es 0-2; alquilo C₁₋₃; hidroxi-alquilo C₂₋₃; CH(OR⁹)(OR¹⁰), en el que R⁹ y R¹⁰ son alquilo C₁₋₃ o tomados juntos forman un puente de etilo o propilo; -(CH₂)_rOC(O)R⁸, en el que R⁸ y r son tal como se definieron anteriormente, y -(CH₂)_rC(O)OR⁸, en el que R⁸ y r son tal como se definieron anteriormente.

30 6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que el resto es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en albúmina sérica bovina, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina de huevo y gamma-globulina bovina.

7. Compuesto de sirolimus según la reivindicación 5, en el que el compuesto de sirolimus de estructura I está unido a un polisacárido por medio de la y en el que el polisacárido está unido además a una partícula.

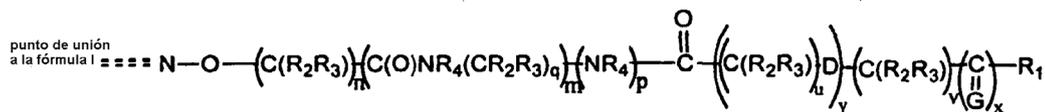
35 8. Compuesto de sirolimus según la reivindicación 7, en el que la partícula es una partícula de cromo.

9. Compuesto según la reivindicación 5, en el que el grupo la tiene la fórmula:



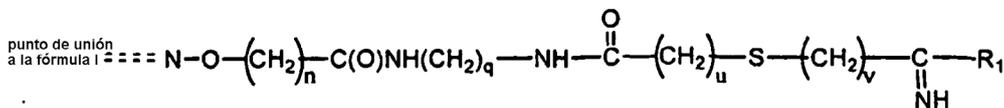
Ib

o en el que el grupo la tiene la fórmula:



Ic

o

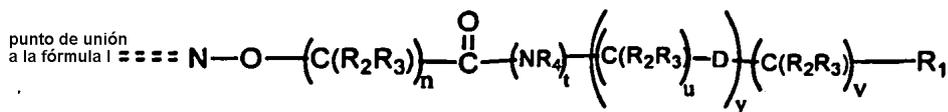


Ic'

5

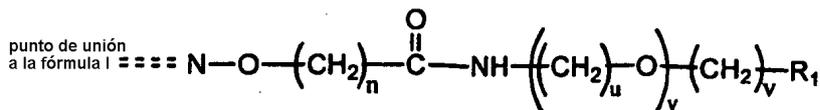
incluyendo sales de imina de Ic',

o en el que el grupo la tiene la fórmula:



Id

o



Id'

10

en el que en Id' n es 1, u es 2, y es 2 y v es 1 y en el que R¹ se une a través de un resto amina de R¹.

10. Anticuerpo producido contra un compuesto según la reivindicación 1 ó 5, en el que el resto es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico que no es de poli(aminoácido) unido en la posición 26.

15 11. Kit que comprende un anticuerpo para un compuesto de sirolimus y un compuesto según la reivindicación 5, en el que el resto es un marcador de poli(aminoácido) o un marcador que no es de poli(aminoácido).

12. Método para determinar un compuesto de sirolimus en una muestra de la que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus, comprendiendo el método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

20

(i) la muestra, y

o bien

(ii) un anticuerpo para el compuesto de sirolimus, y

- (iia) un compuesto según la reivindicación 1, en el que el resto es un marcador de poli(aminoácido) o un marcador que no es de poli(aminoácido),
- o bien
- (iib) un anticuerpo según la reivindicación 10, y
- 5 (iib) un conjugado de marcador de compuesto de sirolimus,
- y
- (b) examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el compuesto de sirolimus y el anticuerpo para sirolimus, indicando la presencia del mismo la presencia del compuesto de sirolimus en la muestra.
- 10 13. Método homogéneo para determinar la presencia o cantidad de un compuesto de sirolimus en un medio que se sospecha que contiene un compuesto de sirolimus, comprendiendo el método:
- a) proporcionar en combinación
- (1) un medio que se sospecha que contiene el compuesto de sirolimus,
- 15 (2) un fotosensibilizador asociado con una primera partícula y que puede generar oxígeno singlete, y
- (3) una composición quimioluminiscente que puede activarse mediante oxígeno singlete y puede asociarse con una segunda partícula,
- en el que un anticuerpo según la reivindicación 10 se asocia con la primera partícula o la segunda partícula o ambas,
- 20 b) someter la combinación a condiciones para la unión del anticuerpo al compuesto de sirolimus, si está presente, e
- c) irradiar el fotosensibilizador con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente, estando relacionada la cantidad de la misma con la cantidad de cada uno de los componentes en el medio.
- 25 14. Método según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo se asocia con la primera partícula en virtud de estar unida a una molécula pequeña y la partícula comprende una pareja de unión para la molécula pequeña y en el que la segunda partícula se recubre con un análogo de rapamicina.

Figura 1

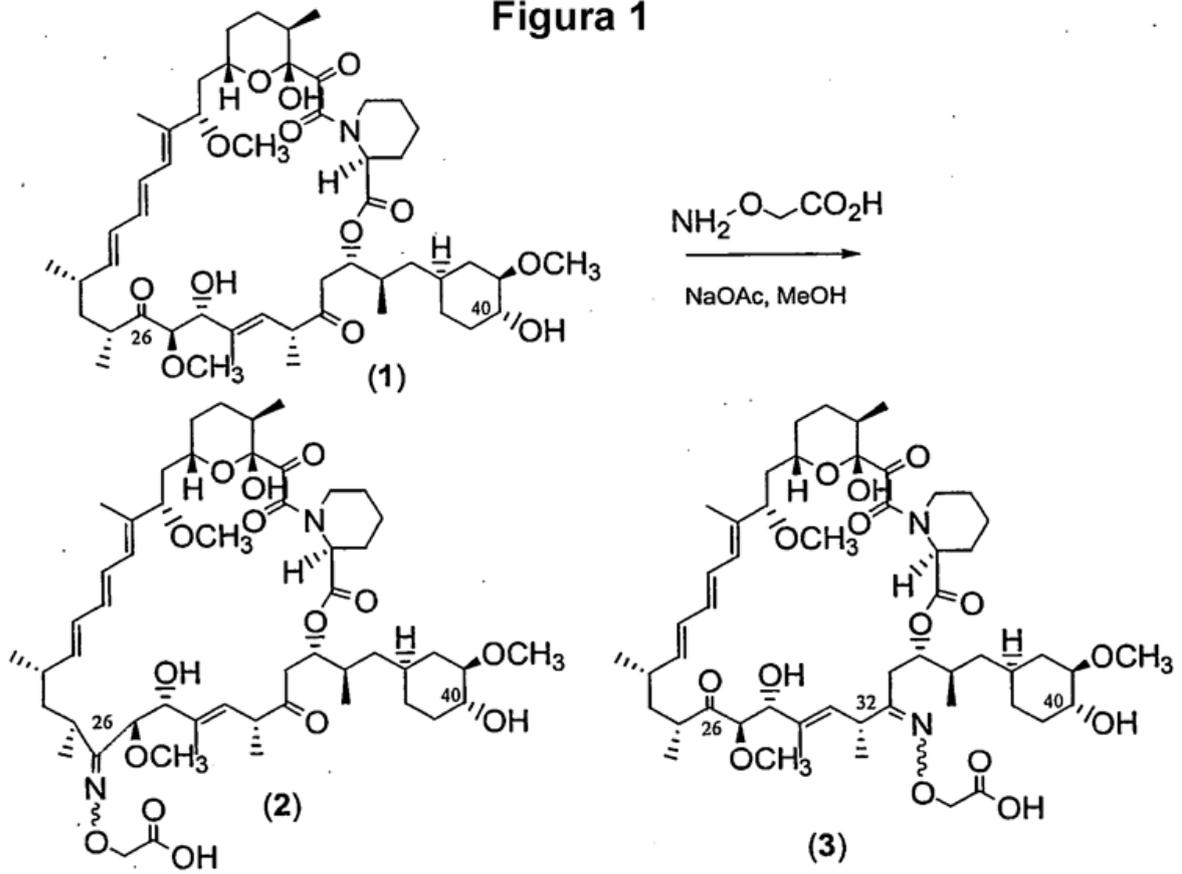


Figura 2

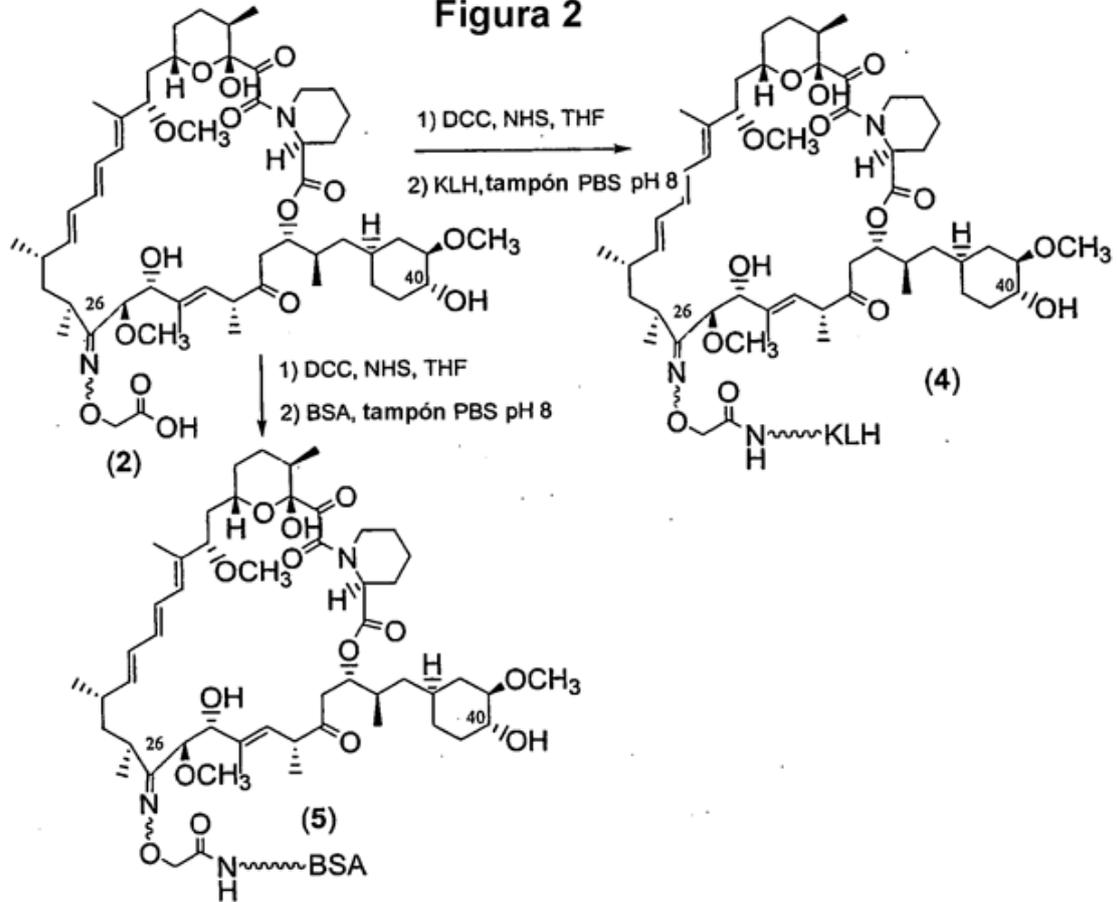


Figura 3

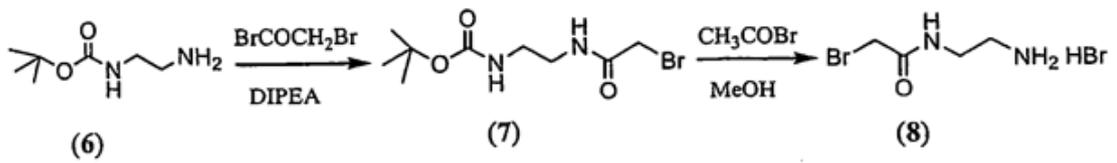


Figura 4

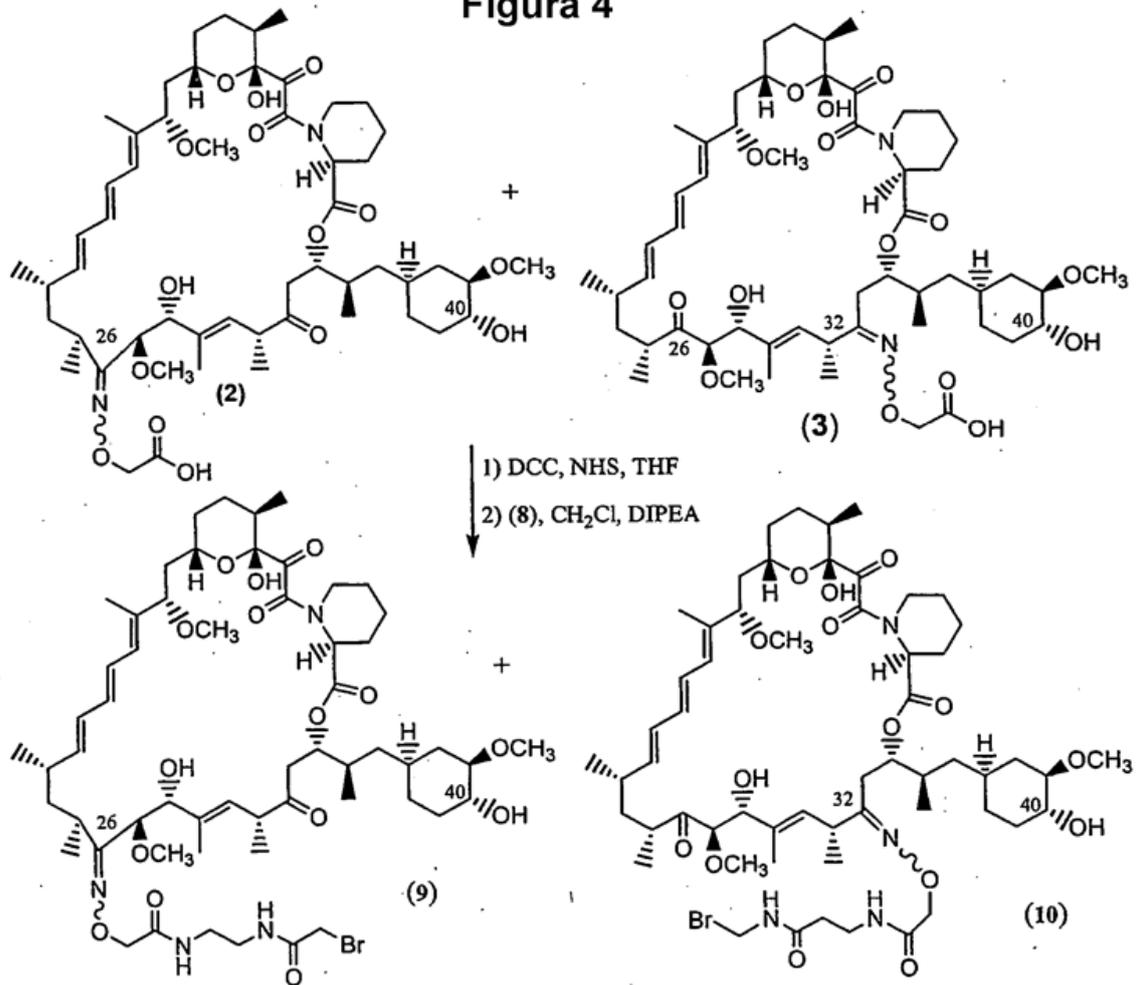


Figura 5

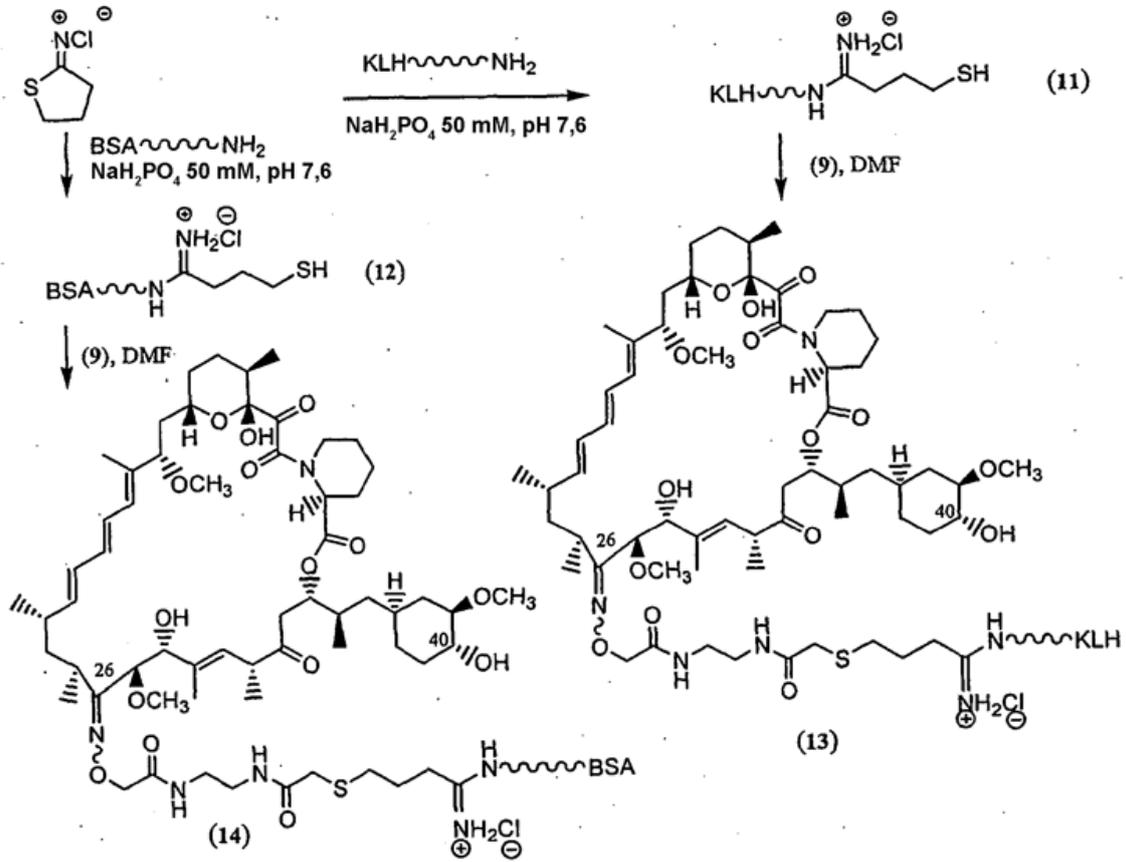


Figura 6

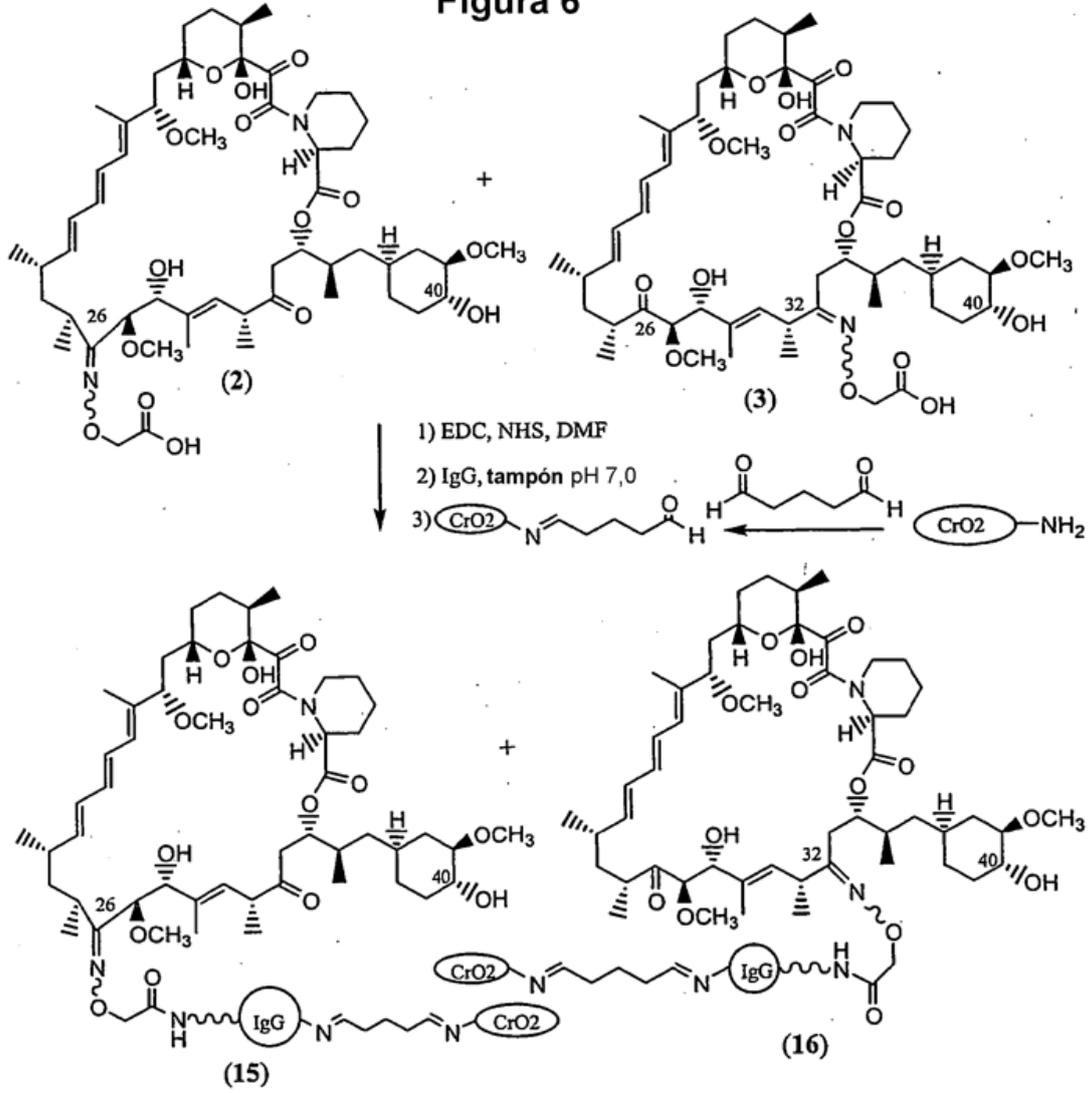


Figura 8

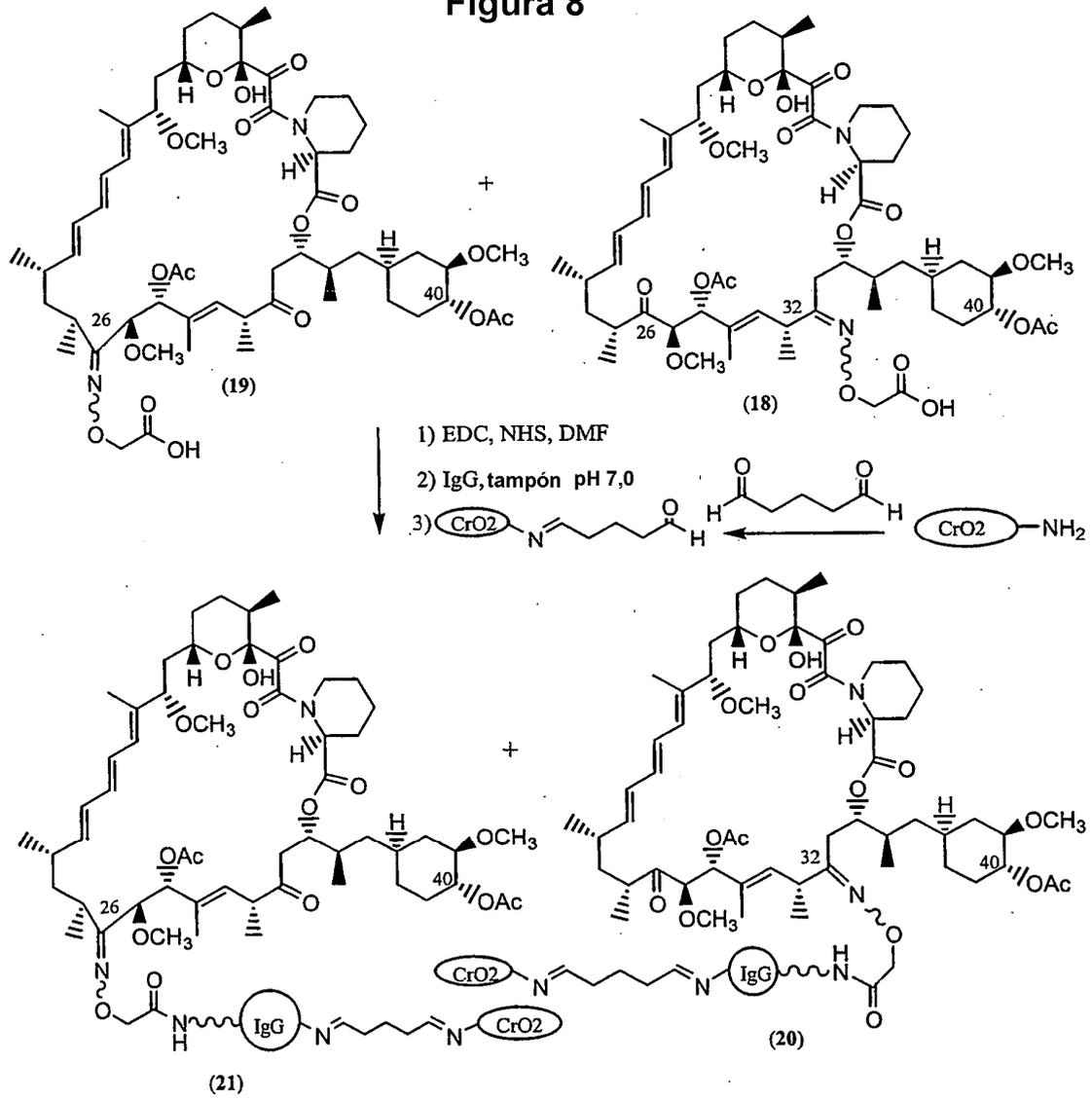


Figura 9

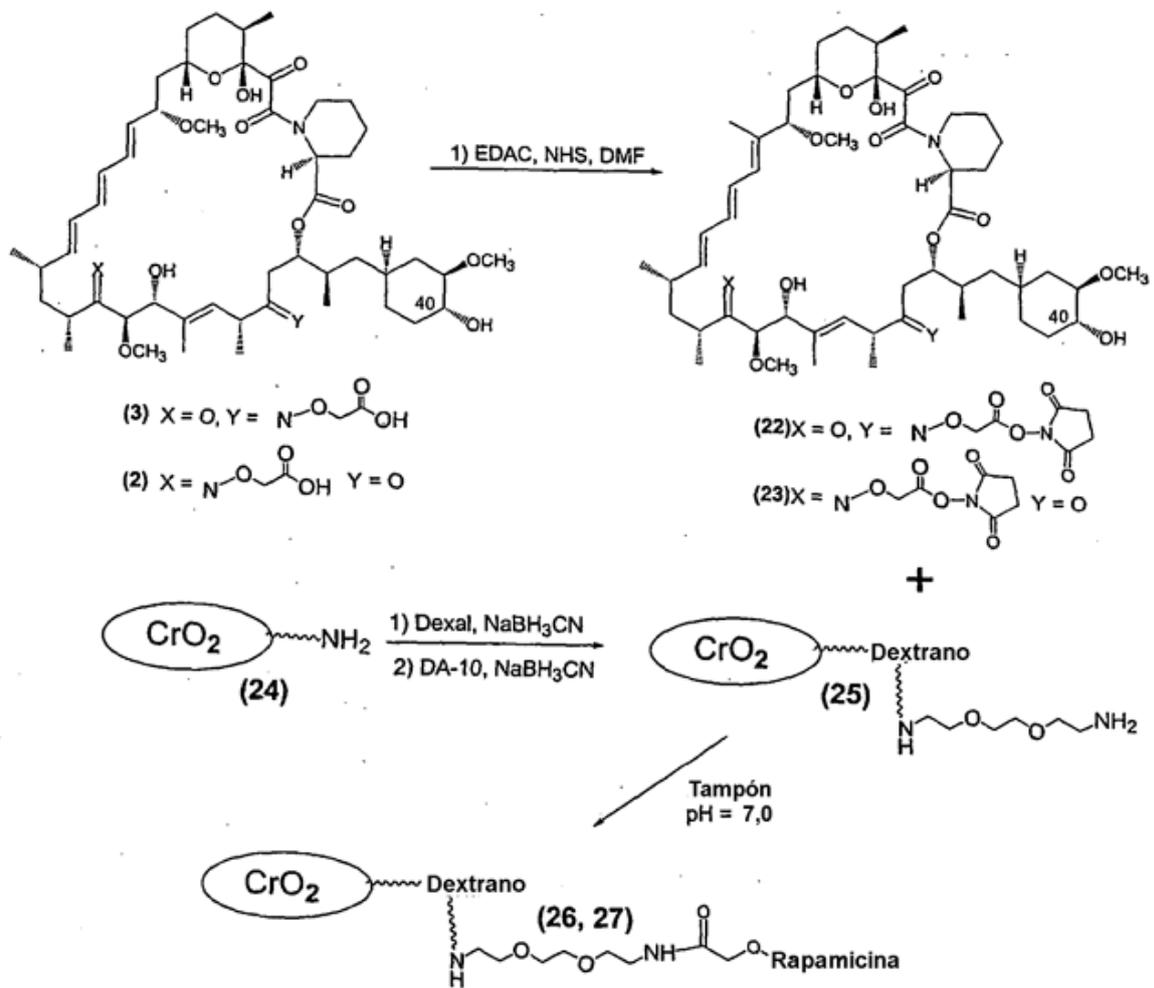


Figura 10

Preparación de conjugado de G6PDH

