(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 360 699**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/32 (2006.01)
C07D 307/88 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)
C07D 473/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04000298 .2**
(96) Fecha de presentación : **09.01.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1441224**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2004**

(54) Título: **Inmunoensayo basado en la inhibición enzimática.**

(30) Prioridad: **14.01.2003 US 341692**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2011

(73) Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es: **Ghoshal, Mitali;**
Sigler, Gerald;
Hui, Raymond A.;
Hawley, Ronald;
Hoess, Eva;
Huber, Erasmus J.;
Patterson, John W.;
Salamone, Salvatore J. y
Dorn, Allan

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo basado en la inhibición enzimática

Antecedentes de la invención

Esta invención está relacionada en general con el campo de la medición de un analito en un medio líquido. Más en especial, está relacionada con un inmunoensayo para la medición de un analito en una muestra biológica.

Boguslaski, R.C. et al., en la Patente Estadounidense Nº 4,134,792 (1979) describe el uso de un modulador enzimático de unión reversible como sustancia de marcaje para la detección de un analito en un medio líquido, y en particular, el uso de inhibidores competitivos acoplados a un análogo del analito en inmunoensayos.

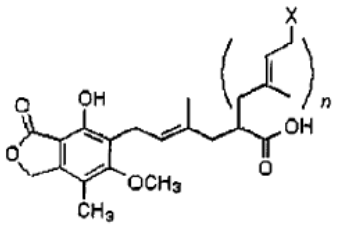
Dorn, A.R., en la Patente Estadounidense con Nº de serie 09/328,741 depositada el 9 de junio de 1999 (US 6,107,052 A) describe un método para la medición enzimática de ácido micofenólico en una muestra biológica, e inmunoensayos que comprenden conjugados de MPA (WO 01/01135 A, Clin. Chem. 47 (2001), 1921-1922).

La inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (EC 1,1,1,205) cataliza la oxidación dependiente de NAD de la inopina-5'-monofosfato (IMP) en xantosina-5'-monofosfato (XMP), Magasanik, B. et al., J. Biol. Chem. 226:339-350 15 (1957) y Jackson et al., Nature 256:331-333 (1975). La enzima sigue una secuencia de reacción Bi-Bi ordenada de unión de sustrato y cofactor y liberación del producto. Primero, la IMP se une a IMPDH. A continuación viene la unión del cofactor NAD. El cofactor reducido, NADH, se libera entonces del producto, seguido del producto, XMP. Este mecanismo difiere del de la mayoría de deshidrogenasas dependientes de NAD conocidas, que poseen un orden aleatorio de adición de sustrato o requieren la unión de NAD previa a la del sustrato.

Dos isoformas de IMPDH humano, denominadas tipo I y tipo II, se han identificado y secuenciado, Collart et al., J. Biol. Chem. 263:15769-15772 (1988) y Natsumeda et al., J. Biol. Chem. 265:5292-5295 (1990). Cada isoforma es de 514 aminoácidos, y ambas isoformas presentan una identidad de secuencia del 84%. Ambas IMPDH de tipo I y tipo II forman tetrámeros activos en solución, con pesos moleculares de las subunidades de 56 kDa, Yamada et al., Biochemistry 27:2737-2745 (1988). 25

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un conjugado ligando-inhibidor con una estructura



En la que n = 1-2 y

x es -N11 -CO-$(CN_2)^3$-fenitoína,

Se describe un inmunoensayo cuantitativo homogéneo específico para ácido micofenólico basado tras la inhibición específica no competitiva de la enzima inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) mediante ácido micofenólico. La inhibición de IMPDH depende solo de la concentración de ácido micofenólico debido a la naturaleza no competitiva de la inhibición por ácido micofenólico. Así, cuanto mayor es la concentración de ácido micofenólico, mayor es la inhibición de la enzima. La reacción se monitoriza midiendo la formación de nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) a 340 nm. La IMPDH cataliza la siguiente reacción:

→ inosina-IMPDH xantosina monofosfato + NADH monofosfato + NAD^+

El desarrollo de un inmunoensayo homogéneo puede lograrse a través de la unión de un ligando a una posición sobre el ácido micofenólico o un derivado de MPA o cualquier inhibidor no competitivo de IMPDH en el que dicha unión no interfiere con la inhibición no competitiva de IMPDH. En ausencia del analito, el anticuerpo específico de analito se une al ligando-derivado de MPA y previene su inhibición de IMPDH. En presencia de analito, el analito se une a su anticuerpo, liberando así el ligando-derivado de MPA para inhibir la IMPDH (Tabla 3, parte C.).

La tasa de formación de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducida) puede medirse mediante la monitorización del cambio de absorción a una longitud de onda de 340 nm, es decir, la región de absorción

característica de NADH, y este cambio en la absorción puede correlacionarse con la concentración de analito.

Las posiciones atractivas para la unión de ligando ocurren en la cadena hexanoica del ácido micofenólico y sus derivados, especialmente en el carbono 4' y el carbono 5' (Figura 1). Varios compuestos reúnen estos criterios. Véase Nelson, P.H. et al., Journal of Medicinal Chemistry 33:833-838 (1990), Rohloff, J.C.,et al., Tetrahedron Letters 36 (43):7803-7806 (1995), Artis, D.R. et al., Publicación PCT WO 95/22536 (1995) y Artis, D.R. et al., Publicación PCT WO 95/22538 (1995). Varios de estos derivados muestran una mayor inhibición que el ácido micofenólico y esto puede impartir una mayor sensibilidad para un inmunoensayo homogéneo. Véase Smith, D.B. et al., J. Org. Chem. 61:2236-2241 (1996).

En una realización preferible de la presente invención, un inhibidor no competitivo, ácido micofenólico (MPA) se acopló a fenitoína como ligando y se utilizó en un inmunoensayo homogéneo para el ácido micofenólico.

El uso de un conjugado inhibidor no competitivo-ligando es preferible sobre un conjugado inhibidor competitivo-ligando ya que el anterior conjugado es bastante menos susceptible a las interferencias de fármacos y sustancias naturales, que normalmente pueden ser inhibidores competitivos de enzimas. Los inhibiditos no competitivos de enzimas son raros en la naturaleza y serán por lo tanto menos susceptibles a las interferencias con fármacos y sustancias naturales.

El inmunoensayo homogéneo descrito anteriormente puede utilizarse para medir cualquier analito. Aquí se ejemplifica específicamente su uso para la medición de ácido micofenólico, digoxigenina, tiroxina y teofilina. También se piensa que el uso para la medición de cualquier analito incluyendo fármacos o derivados de fármacos, hormonas, polipéptidos y oligonucleótidos. Ejemplos de otros fármacos o derivados de fármacos que pueden ser adecuados para el ensayo utilizando el método, incluye fármacos terapéuticos como antibióticos, por ejemplo, gentamicina, amicacina, tobramicina, netilmicina y vancomicina; fármacos cardíacos, por ejemplo, digoxina, digitoxina, N-acetil-procainamida, procainamida, quinidina y lidocaína; fármacos anticonvulsivos, por ejemplo, fenitoína, (de acuerdo con la presente invención) fenobarbital, primidona, ácido valproico, etosuximida y carbamazepina; analgésicos, por ejemplo, acetaminofen y ácido acetilsalicílico; e inmunosupresores, por ejemplo, MPA, ciclosporina, rapamicina (sirolimus) y FK506 (tacrolimus), y fármacos de abuso como anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, cannabinoides, metabolito de cocaína (benzoilecgonina), metadona, opiáceos, fenciclidina, propoxifeno y LSD. Ejemplos de hormones que pueden ser adecuadas para el ensayo utilizando el método descrito incluye tiroxina, hormona estimuladora de la tiroides, estrógeno, progesterona, testosterona, prolactina, hormona estimuladora de los folículos, gonadotropina coriónica y hormona luteinizante. Ejemplos de polipéptidos que pueden ser adecuados para el ensayo utilizando el método incluye proteínas y epítopos como hemoglobina A1c, troponina-T y troponina-I. Ejemplos de oligonucleótidos que pueden ser adecuados para el ensayo utilizando el método descrito incluye secuencias específicas de oligonucleótido que pueden hibridar bajo condiciones astringentes con secuencias suficientemente específicas para la detección y cuantificación de la gonorrea, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), clamidia e infecciones de hepatitis.

También se describe un equipo de pruebas para llevar a cabo un ensayo para la determinación de analito mediante el método de la presente invención que comprende, en combinaciones empaquetadas, una o más composiciones de reactivos que comprende NAD, IMPDH, IMP y un conjugado que comprende MPA y un ligando del analito.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la estructura de ácido micofenólico y la estructura del conjugado ligando-inhibidor, MPA-MPA (bis-MPA).

La Figura 2 es una gráfica preparada mediante la representación de los resultados obtenidos en el Ejemplo 20 en el que se analizaron las muestras que contienen tiroxina. La concentración de tiroxina está representada en el eje X y la absorbancia delta (criterio de valoración) a 340 nm está representada en el eje Y.

La Figura 3 es una gráfica preparada mediante la representación de los resultados obtenidos en el Ejemplo 23 en el que se analizaron las muestras que contienen digoxigenina. La concentración de digoxigenina está representada en el eje X y la absorbancia delta (criterio de valoración) a 340 nm está representada en el eje Y.

La Figura 4 es una gráfica preparada mediante la representación de los resultados obtenidos en el Ejemplo 26 en el que se analizaron las muestras que contienen digoxigenina. La concentración de digoxigenina está representada en el eje X y la tasa de absorbancia a 340 nm está representada en el eje Y.

La Figura 5 es una gráfica preparada mediante la representación de los resultados obtenidos en el Ejemplo 29 en el que se analizaron las muestras que contienen teofilina. La concentración de teofilina está representada en el eje X y la tasa de absorbancia a 340 nm está representada en el eje Y.

La Figura 6 ilustra la preparación del éster metílico de 5'-isoprenil-[OH]-MPA-[OMEM] como se ha descrito en los Ejemplos 4, 5, 6 y 7.

La Figura 7 ilustra la preparación del conjugado del éster metílico 5'- [isopreniloxicarbonilaminoetilen-amido)-tiroxina(N-tBoc)]-MPA [OMEM] como se ha descrito en los Ejemplos 8, 9 y 10.

La Figura 8 ilustra la preparación de L-tiroxina(N-tBoc)-amidoetilenamina como se ha descrito en el Ejemplo 9.

La Figura 9 ilustra la preparación del conjugado 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina]-MPA como se ha descrito en los Ejemplos 11 y 12.

La Figura 10 ilustra la preparación del éster de 5'-carboximetil-MPA t-butilo como se ha descrito en los Ejemplos 13, 14 y 15.

La Figura 11 ilustra la preparación del conjugado de éster de 5'-(digoxigenina-3-il-ß-amidometil)-MPA t-butilo como se ha descrito en el Ejemplo 16.

La Figura 12 ilustra la preparación del conjugado 5'-(digoxigenina-3-il-ß-amidometil)-MPA, isómero A e isómero B, como se ha descrito en el Ejemplo 17.

Las Figuras 13 y 14 ilustran la preparación de 4'-(digoxigenina-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA, como se ha descrito en los Ejemplos 31 y 32.

La Figura 15 ilustra la preparación del conjugado del éster metílico de 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)-isoprenil]-MPA [OMEM] como se ha descrito en el Ejemplo 33.

La Figura 16 ilustra la preparación de 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)-isoprenil]-MPA como se ha descrito en el Ejemplo 35.

La Figura 17 ilustra la preparación del éster metílico de 5'-(succinimido-N-oxi)carbonilmetil-MPA como se ha descrito en los Ejemplos 36, 37, 38 y 39.

La Figura 18 ilustra la preparación de 5'-[(digoxigenina-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA como se ha descrito en los Ejemplos 40 y 41.

La Figura 19 ilustra la preparación del éster metílico de MPA[OMEM]-5'-isoprenilamina (B) como se ha descrito en los Ejemplos 44 y 45.

La Figura 20 ilustra la desprotección del éster metílico de MPA[OMEM]-5'-isoprenilamina (B) en MPA-5'-isoprenilamina (D) mediante MPA[OMEM]-5'-isoprenilamina (C) como se ha descrito en el Ejemplo 46.

La Figura 21 ilustra la preparación del conjugado 5'-(digoxina(1,4-oxazepin))-4-il]-fenil-4-carbonil]amino]isoprenil]-MPA (H) como se ha descrito en el Ejemplo 47.

La Figura 22 ilustra la preparación del conjugado 5'-(digitoxina(1,4-oxazepin))-4-il]-fenil-4-carbonil]amino]isoprenil]-MPA (L) como se ha descrito en el Ejemplo 48.

Las Figuras 23a y 23b ilustran la preparación del conjugado 5'-(gentamicina-C1a]-N1-carboniloxi)-isoprenil]-MPA (R) como se ha descrito en los Ejemplos 49, 50 y 51

Las Figuras 24a y 24b ilustran la preparación del conjugado 5'-(gentamicina-C1a]-N1-tereftaloil)-amino-isoprenil]-MPA (enlace amida, U) como se ha descrito en los Ejemplos 52, 53 y 54.

La Figura 25 ilustra la preparación del conjugado 5'-(fenitoína-3-butiramido)-isoprenil]-MPA (Y) como se ha descrito en los Ejemplos 55, 56 y 57.

La Figura 26 ilustra la capacidad del ensayo de cuantificar la fenitoína en muestras de pacientes en comparación con un método de polarización por fluorescencia como se ha descrito en el Ejemplo 58.

La Figura 27 ilustra la capacidad del ensayo de cuantificar la gentamicina en muestras de pacientes en comparación con un método de polarización por fluorescencia como se ha descrito en el Ejemplo 58.

La Figura 28 ilustra la preparación de MPA-isoprenil alcohol (racémico, 3A) como se ha descrito en el Ejemplo 5A.

La Figura 29 ilustra la preparación de MPA-isoprenil alcohol (quiral, enantiómero R, 3B) como se ha descrito en el Ejemplo 5B.

Descripción detallada de la invención

Se ha encontrado que existen algunas propiedades de la inhibición del ácido micofenólico sobre el IMPDH que pueden facilitar el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos homogéneos. La sensibilidad (10-20 nM) de la inhibición del ácido micofenólico y su inhibición no competitiva favorecen su utilización en inmunoensayos enzimáticos homogéneos. Mediante el acoplamiento cuidadoso de un ligando al ácido micofenólico para formar un conjugado ligando-inhibidor, uno puede desarrollar un inmunoensayo enzimático homogéneo para un analito específico. El acoplamiento de un ligando a un inhibidor no competitivo es preferible ampliamente en el caso específico de la medición del ácido micofenólico ya que existen muchos inhibidores competitivos de IMP y NAD y reducirían la especificidad del ensayo. En general, la utilización de inhibidores competitivos en conjugados ligando-inhibidores conducirá a interferencias en el rendimiento del ensayo ya que existen muchos fármacos y sustancias naturales que actúan como inhibidores competitivos, que reducirían enormemente la especificidad.

Un inhibidor no competitivo de la enzima IMPDH es una sustancia que inhibe mediante la unión al sitio activo de la enzima y no compite con IMP o NAD por la inhibición de la enzima. La inhibición no competitiva sucede cuando un inhibidor se combina de forma reversible con el complejo IMPDH-XMP en el centro activo de la enzima para formar el complejo IMPDH-XMP-inhibidor, que es entonces incapaz de liberar el producto XMP. Este tipo de inhibición no es reversible mediante el aumento de la concentración de sustrato. El NADH se libera tan solo una vez, mientras que XMP no se libera. Por otro lado, los inhibidores no competitivos se unen a un sitio diferente del sitio de unión del sustrato. La inhibición no competitiva tampoco es reversible mediante el aumento de la concentración de sustrato.

La enzima IMPDH preferible para su utilización es la enzima recombinante IMPDH-II de linfocitos T humanos.

La sensibilidad del presente inmunoensayo hacia la concentración de analito puede modificarse a través de la utilización de diferentes formas de IMPDH que varían su sensibilidad a la inhibición por MPA. Por ejemplo, las constantes de inhibición (K_i) de varias formas de IMPDH humana para MPA son las siguientes:

Forma de IMPDH	K_i (CI_{50})	Referencia
IMPDH-I	37 nM	J. Biol. Chem. 268, 27286-27290 (1993)
IMPDH-II	9,5 nM	J. Biol. Chem. 268, 27286-27290 (1993)
IMPDH-II ser 275 → ala 275	4 nM	Cell 85, 921-930 (1996)

Ya que las diferentes formas de enzima poseen sensibilidades variadas a la inhibición de MPA, estas también poseen sensibilidades variadas a la inhibición de por inhibidores de ligando y así poseen la utilidad en la producción de inmunoensayos con niveles diferentes de sensibilidad o rangos de medición de analitos.

La invención proporciona el ajuste de la sensibilidad del ensayo. El ajuste o modificación de la sensibilidad del ensayo no es fácilmente obtenible sin la utilización de diferentes formas de IMPDH de sensibilidad variada a MPA o derivados de MPA o cualquier inhibidor no competitivo de IMPDH.

Muestra sospechosa de contener el analito: cualquier muestra que es razonablemente sospechosa de contener el analito, es decir, ácido micofenólico u otro inhibidor de IMPDH, puede analizarse mediante el método descrito anteriormente. La muestra es normalmente una solución acuosa como un fluido corporal de un huésped, por ejemplo, orina, sangre completa, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco o similares, pero preferiblemente es plasma o suero. La muestra puede pretratarse se desea y puede prepararse en cualquier medio adecuado que no interfiera con el ensayo. Es preferible un medio acuoso.

Medición de la cantidad de ácido micofenólico: Los métodos cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos así como el resto de métodos para determinar el ácido micofenólico se considera que son métodos para medir la cantidad de ácido micofenólico. Por ejemplo, un método que tan solo detecta la presencia o ausencia de ácido micofenólico en una muestra sospechosa de contener ácido micofenólico se considera para ser incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para medir, están contemplados dentro del alcance de la presente invención.

La determinación de MPA puede llevarse a cabo mediante un método de ensayo cinético el que se mide el cambio en la absorbancia de NADH por unidad de tiempo o mediante un método de criterio de valoración en el que se para la reacción tras haber transcurrido cierto periodo de tiempo. El método puede aplicarse fácilmente en analizadores automatizados para análisis de laboratorio o análisis clínico. Ejemplos de analizadores de laboratorio automatizados son los analizadores de las series COBAS INTEGRA y ROCHE/ HITACHI (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). También se contemplan otros métodos para medir NADH, por ejemplo, la reducción de NAD está acoplada a la reducción de una sal de tetrazolio, cloruro de 2-p-nitrofenil-5-fenil tetrazolio (INT), con metosulfato de fenazina sirviendo como o transportador intermedio de electrones, tal como se ha descrito en Babson, A.L. et al, Clinical Chemistry 19(7):766-769 (1973).

El material de calibración significa cualquier material estándar o de referencia que contiene una cantidad conocida del analito a medir. La muestra sospechosa de contener el analito y el material de calibración se analizan bajo condiciones similares. La concentración de analito se calcula entonces mediante la comparación de los resultados obtenidos para el espécimen desconocido con los resultados obtenidos para el estándar. Esto se realiza asiduamente mediante la construcción de una curva de calibración como en las figuras 2, 3, 4 y 5.

Materiales complementarios: Normalmente se emplean con frecuencia varios materiales complementarios en un ensayo de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los tampones estarán normalmente presentes en el medio de ensayo, así como estabilizadores para el medio de ensayo y los componentes de ensayo. Con frecuencia, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas adicionales, como albúmina, o tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos, o similares.

IMPDH se refiere a la enzima inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa, EC 1,1,1,205, que cataliza la formación de xantin-5'-monofosfato a partir de inosina-5'-monofosfato. La presente invención contempla el uso de IMPDH a partir de fuentes naturales o recombinantes o mutantes dirigidos al sitio, y puede utilizarse cualquier isoforma, mutante dirigido al sitio o una mezcla de isoformas.

Debe entenderse que cualquier referencia a lo largo de la especificación y las reivindicaciones respecto al ácido micofenólico pretende cubrir al ácido micofenólico así como a sus metabolitos y derivados biológicamente activos y terapéuticamente activos, que se comportan en un sentido biológico, es decir, a través de la inhibición de IMPDH, como el ácido micofenólico.

También se describen equipos útiles para realizar de forma adecuada los métodos de ensayo para la determinación de un analito. Para aumentar la versatilidad de la presente invención, los reactivos útiles en los métodos tal como se ha descrito pueden proporcionarse en una combinación empaquetada, en el mismo contenedor o en contenedores separados, en forma líquida o forma liofilizada por lo que la proporción de los reactivos proporciona una optimización sustancial del método y ensayo. Los reactivos pueden estar cada uno de ellos en contenedores separados o varios reactivos pueden combinarse en uno o más contenedores dependiendo de la reactividad cruzada y estabilidad de los reactivos.

El equipo comprende NAD, un conjugado ligando-inhibidor que comprende un inhibidor de IMPDH y un ligando del analito, IMP y IMPDH. Los reactivos pueden permanecer en forma líquida o pueden liofilizarse. El equipo puede comprender además la calibración y materiales control.

Los métodos descritos poseen aplicaciones más allá de la medición del ácido micofenólico. Utilizando la aproximación descrita aquí, puede utilizarse cualquier ligando (como por ejemplo, pero sin limitarse a, teofilina, digoxina, fenitoína (de acuerdo con la invención) fragmentos peptídicos, oligonucleótidos, morfina, cocaína etc.) que han derivado con un grupo reactivo apropiado para la unión de ácido micofenólico o derivados de MPA o cualquier enzima inhibidor no competitivo de IMPDH adecuadamente derivado en la posición 4' o la posición 5' para medir el correspondiente analito en una muestra desconocida. La derivación en estas posiciones crea nuevos centros ópticamente activos. Se tienen en cuenta los estereoisómeros.

Una característica central es la capacidad de sintetizar derivados de MPA sustituidos en la posición 5' con un grupo de unión adecuado que puede llegar a acoplarse a derivados del fármaco. Se han descrito dos tipos diferentes de grupos de unión, los derivados farmacológicos de 5'-carboxialquil-MPA y derivados farmacológicos de 5'-isoprenilo unido a MPA.

La sustitución en la posición 5' del éster de MPA implica una reacción de alquilación utilizando halo acetato de alquilo en presencia de sodio bis(trimetilsilil)amida y DMPU a bajas temperaturas. El uso de HMPA en lugar de DMPU parece mejorar las reacciones de alquilación en general. Esta reacción de alquilación puede extenderse para utilizar propionato de halo alquilo o butirato de halo alquilo para preparar éster de 5'-carboxietil MPA o éster de 5'-carboxipropil MPA tras la hidrólisis éster selectiva en el enlace. La función carboxilo en el enlazante permite entonces una amplia variedad de rutas sintéticas mediante la conversión a un éster activo y después al acoplamiento a derivados farmacológicos adecuadamente derivados, más comúnmente, un fármaco con un grupo amino que contiene un enlazante para generar un enlace amida.

La sustitución en la posición 5' del éster de MPA utilizando el enlazante bromo-isoprenil (1) en presencia de bis (trimetilsilil)amida de sodio y HMPA proporciona el derivado MPA 5'-isoprenil TBDPS. La hidrólisis del grupo TBDPS proporciona 5' isoprenil[OH]-MPA[OMEM] (5). Este intermediario alcohol clave se activa mediante la conversión en carbonato de N-hidroxisuccinimidilo mediante tratamiento con carbonato de disuccinimidilo en presencia de trietilamina. El carbonato activado se utilizó sin el aislamiento para acoplarse a los fármacos amino modificados para proporcionar conjugados de fármaco MPA con un enlace de uretano. El enlace de uretano puede también producirse mediante el uso de la activación del alcohol con 1,1'-carbonildiimidazol o cloroformato de p-nitrofenilo y la reacción de los intermediarios con los derivados farmacológicos con el grupo amino modificado. Esta síntesis puede extenderse a conjugados de fármaco MPA bis-isoprenilo mediante el uso de bromo-bis isoprenilo TBDPS. El bromo-

bis-isoprenilo TBDPS puede prepararse a partir de derivados de geraniol siguiendo el procedimiento de la literatura como se describe para cloro-bis-isoprenilo TBDPS en J.Org. Chem. 62, 3529 (1997).

Los conjugados MPA-fármaco con un enlazante uretano (carbamato) en el enlace, tal como se ha discutido anteriormente, puede entonces desprotegerse utilizando reactivos conocidos en la materia, pero normalmente con la necesidad de algún cuidado. Como ejemplo, el grupo protector en el hidroxifenólico del núcleo de benceno de MPA en sí, como por ejemplo, el grupo metoxietoximetilo (grupo MEM) utilizado en varios de los ejemplos puede eliminarse con el comúnmente utilizado ácido trifluoroacético (TFA) diluido en cloruro de metileno (CH_2Cl_2). No obstante, la aplicación de las condiciones estándar o frecuentemente utilizadas resulta en la escisión del enlazante carbamato en el enlace también, separando el fármaco del MPA, como se ejemplifica mediante la ruptura del conjugado protegido MPA-tiroxina (9) cuando se trata con 1:1 TFA en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. La aplicación de cantidades diluidas y limitadas de TFA in CH_2Cl_2 a bajas temperaturas bajo condiciones cuidadosamente controladas, no obstante, y tal como se ejemplifica en la presente invención, se obtuvieron con éxito los conjugados desprotegidos MPA-fármaco deseados. Un ejemplo adicional de la desprotección cuidadosa necesaria se ilustra mediante la desprotección del conjugado MPA-gentamicina completamente protegido (N) en el conjugado final deseado MPA-gentamicina desprotegido (R) en el que una vez necesaria la eliminación secuencial de los grupos éster metílico y N-trifluoroacetato, utilizando condiciones básicas suaves, seguido de la eliminación de tres grupos t-BOC y un grupo MEM, logrado bajo condiciones acídicas suaves pero controladas.

Debido al cuidado extra necesario en las secuencias de desprotección cuando el enlazante contenido en el enlazante uretano o grupo, el uso de un enlazante amida en su lugar presenta beneficios incluyendo mucha más estabilidad y resistencia a la ruptura bajo condiciones suaves. De forma complementaria al uso de los derivados carboxialquilo MPA descritos anteriormente, el uso de un derivado MPA5'-isoprenilamina (como alternativa al 5'-isoprenil alcohol descrito anteriormente) generará el correspondiente conjugado MPA-fármaco con un enlazante amida más estable.

Hacia este fin; el correspondiente análogo de MPA-5'-isoprenilamina puede generarse mediante una reacción de Mitsunobu sobre el derivado de 5'-isoprenil[OH]-MPA[OMEM] (5) discutido anteriormente. La isomerización alrededor del doble enlace se observó cuando utilizamos una secuencia de conversión de múltiples pasos, por ejemplo, la conversión del alcohol en el bromuro, seguido por la conversión en la azida y la hidrólisis en la amina. No obstante, la reacción en un paso del MPA-5'-isoprenil alcohol con trifenilfosfina y ftalimida en presencia de un agente activador/ mediador como diisopropil azodicarboxilato (DIAD) proporcionando la MPA ftalimida deseada, que tras el tratamiento con metilamina en etanol proporcionó MPA-5'-isoprenilamina (B), tal como se muestra en la figura 19. Utilizando esta amina, el conjugado MPA-fenitoína (Y) (de acuerdo con la invención) y el conjugado MPA-gentamicina (U) que contienen ambos el enlazante estable amida se prepararon como se ha descrito en las figuras 25 y 24a, b respectivamente.

Los derivados de MPA-digoxigenina (es decir cuando las porciones de azúcar de digoxina no están) tal como se muestra en las figuras 11, 12, 13 y 14 contienen enlazantes amida y se sintetizaron a partir de los correspondientes derivados de digoxigenina-amina y un análogo de MPA 5'-carboxialquilo. Por contra, el análogo de digoxina oxazepina (G), tal como se muestra en la figura 21, permite el uso de MPA-5'-isoprenilamina descrito anteriormente para formar el conjugado MPA-digoxina (H), también con un enlace amida, así como mantener los azúcares de digoxina presentes. El correspondiente análogo de digitoxina oxazepina (K) permite la síntesis del conjugado MPA-digitoxina (L) también con los azúcares presentes.

No obstante, se ha encontrado más eficaz convertir la MPA amina protegida (B) en la MPA5'-isoprenilamina completamente desprotegida (D), tal como se muestra en la figura 20, antes de la reacción con (G) o (K), y tal como se muestra en las figuras 21 y 22. Las causas de esta variación fueron la sensibilidad de los diferentes grupos funcionales como las lactonas y los enlaces glicosídicos, y en particular la sensibilidad de la digoxina o azúcares de digitoxina hacia la ruptura en los enlaces glicosídicos especialmente en la unión entre la posición C3 del núcleo esteroide y la primera porción de azúcar, bajo condiciones suaves. Como ejemplos, la reacción de la MPA amina protegida (B) con (G) proporcionó el correspondiente conjugado protegido que posee los grupos MEM y éster metílico que, bajo un tratamiento básico suave (hidrólisis del éster), proporcionó material con uno o ambos grupos lactona abiertos; mientras que la reacción de la MPA amina parcialmente desprotegida (C) con (G) proporcionó el correspondiente conjugado parcialmente protegido que posee el grupo MEM que bajo un tratamiento ácido suave (TFA en CH_2Cl_2) proporcionó material con el núcleo esteroide de digoxigenina escindido pero con el grupo MEM aún presente.

Estos análogos de oxazepina (G) de digoxina, y (K) de digitoxina, así como los ácidos precursores (F) y (J) respectivamente, en y de ellos mismos son sustancias útiles con ventajas sobre otros análogos conocidos de oxazepina de los dos fármacos. En particular, la incorporación de la porción de aminobenzoato dota a la molécula de absorbancia UV sustancial a longitudes de onda superiores a 300 nm, que las sustancias del estado anterior de la técnica no tienen. Esto permite la fácil visualización e identificación/ cuantificación de conjugados utilizando estos nuevos derivados, como en compuestos con otras bandas de absorbancia UV, o en muchos conjugados de proteína o polipéptido en el que el pico característico típico de absorbancia UV está en, por ejemplo, 280 nm, ya que la absorbancia UV debida al análogo de digoxina o digitoxina está separada de y a mayores longitudes de onda de las

absorbancias UV debido a la proteína o polipéptido.

La MPA-5'-isoprenilamina completamente desprotegida (D) puede también utilizarse con cualquier otro análogo de amina-fármaco reactivo, como pero sin limitarse a, ésteres de fármaco-NHS o otros derivados de fármaco-éster activados, para formar conjugados MPA-fármaco con un enlazante amida estable. El grupo amino de la MPA-5'-isoprenilamina completamente desprotegida (D), siendo la más nucleofílica entre los tres grupos funcionales presentes, reaccionará bajo condiciones normales en el que está presente como la base libre que reacciona fácilmente con dichos fármacos derivados sin una interferencia significativa de los otros grupos. Dicha aproximación permite la síntesis de conjugados MPA-fármaco a partir de fármacos adecuados derivados sin cualquier paso adicional de desprotección o manipulaciones químicas que puede ser perjudiciales para la integridad del conjugado completo.

De forma similar, la MPA-5'-isoprenilamina protegida (B), o la amina parcialmente desprotegida (C), puede utilizarse con cualquier otro análogo de fármaco amina-reactivo, como por ejemplo pero sin limitarse a, ésteres de fármaco-NHS u otros derivados de fármaco-éster activado, para formar conjugados MPA-fármaco con un enlazante amida estable, seguido por la desprotección en los conjugados fármaco- MPA finales.

De forma adicional, tanto la MPA-5'-isoprenil amina protegida (B), o (C), o la amina completamente desprotegida (D), todas ellas aminas primarias, pueden convertirse en las correspondientes alquil amina inferior secundarias mediante la alquilación en el grupo amino a través de métodos bien conocidos en la técnica. Estas sustancias pueden utilizarse entonces para formar otros conjugados MPA-fármaco mediante la reacción entre estas aminas secundarias con fármacos que contienen un enlace con un halógeno (por ejemplo, Cl o Br o I) como grupo saliente, cuando el fármaco en sí no contiene grupos lábiles adicionales. En muchos casos también pueden reaccionar con otros análogos de fármaco amina-reactivos, como los ésteres de fármaco-NHS o fármaco-isotiocianatos o fármaco-tosilatos y similares, u otros derivados de fármaco-éster activado, para formar conjugados de MPA-fármaco. La desprotección del OMEM y de los grupos éster carboxílico, o de otros grupos protectores que pueden utilizarse o pueden estar presentes, pueden efectuarse entonces utilizando los métodos similares a los descritos en esta invención, o mediante los métodos fácilmente conocidos por los practicantes expertos en la materia. De forma similar, las aminas primarias anteriores (B), (C), o (D) pueden también utilizarse de forma análoga para generar los correspondientes conjugados MPA-fármaco. Otras combinaciones entre dichas aminas MPA y análogos de fármacos serán sugeridos por los expertos en la materia.

Finalmente, el MPA-5'-isopreniltiol puede prepararse mediante conversión del correspondiente isoprenilalcohol en un tosilato o mesilato, seguido opcionalmente por la sustitución con haluro, preferiblemente bromuro o yoduro, para proporcionar un haluro de MPA-5'-isoprenilo. Estos compuestos pueden convertirse fácilmente en el tiol a través de los métodos conocidos por el experto en la materia, como, por ejemplo, reacción con tiourea seguido por hidrólisis básica; o mediante reacción con tioacetato, preferiblemente como una sal metálica, seguida por escisión básica suave del grupo acetilo.

La inhibición de IMPDH por el ácido micofenólico se describe en Anderson, J.H. et al., Journal of Biological Chemistry 243(18):4762-4768 (1968). Los inhibidores de IMPDH también se describen en las Patentes Estadounidenses. Nº 5,380,879, 5,444,072, 5,493,030, 5,536,747, 5,633,279 y 5,807,876 y en las publicaciones PCT WO 94/01105 y WO 94/12184.

El clonaje y expresión de IMPDH humano en E. coli se ha descrito por Konno, Y. et al., J. Biol. Chem 266(1):506-509 (1991). Collart, F.R. et al., Patente Estadounidense Nº 5,665,583 (1997) también describe el clonaje y expresión en E. coli de IMPDH humano.

Analito se refiere a la sustancia, o grupo de sustancias, cuya presencia o cantidad en un medio líquido debe determinarse y pretende incluir cualquier fármaco o derivado de fármaco, hormona, antígeno de proteína u oligonucleótido.

Anticuerpo, o preferiblemente, receptor, indica una pareja de unión específica del analito y es cualquier sustancia, o grupo de sustancias, que posea una afinidad de unión específica para el ligando para la exclusión de otras sustancias.

Ligando significa cualquier sustancia, o grupo de sustancias, que se comporta esencialmente igual que el analito respecto a la afinidad de unión del anticuerpo por el analito y pretende incluir cualquier fármaco o derivado de fármaco e isómeros de los mismos, hormona, polipéptido, o nucleótido.

Un ejemplo de la medición de un fármaco involucrará el acoplamiento de tiocianato de morfina o derivados de éster de cocaína NHS descritos por Salamone, S.J. et al., Patente Estadounidense Nº 5,618,926 (1997) en los derivados alquilamino 4' o 5' sustituidos de ácido micofenólico o derivados de MPA o cualquier inhibidor no competitivo de IMPDH para medir la morfina o cocaína en muestras desconocidas. La representación de la concentración de fármaco versus la actividad de IMPDH puede producir un ensayo cuantitativo.

También se describe que las aplicaciones descritas pueden también utilizarse en el diagnóstico molecular para determinar la presencia de una diana de DNA o RNA específica. En este caso un conjugado nucleótido-ácido micofenólico (N-MPA) será capaz de inhibir IMPDH cuando no es parte de una cadena de oligonucleótido. Una vez el N-MPA está incorporado en una cadena de oligonucleótido, la capacidad de la porción de ácido micofenólico del conjugado de inhibir IMPDH será modulada.

El conjugado N-MPA puede prepararse de acuerdo con los procedimientos que son bien conocidos en la materia. El nucleótido puede derivarse a través de la porción de azúcar, base o fosfato de forma que pueda permitir ser un sustrato para enzimas que sintetizan oligonucleótidos. Por ejemplo una base de nucleótido derivado puede tener un éter que contiene un electrófilo o nucleófilo. Este derivado puede reaccionar entonces con una molécula de MPA apropiadamente derivada para formar un conjugado de N-MPA.

El ensayo se realizará añadiendo un porcentaje del conjugado N-MPA a la mezcla de nucleótido que se utilizará para sintetizar el oligonucleótido. Se añadirá una muestra junto con las enzimas, y sondas utilizadas para polimerizar el oligonucleótido, polimerasas de DNA y RNA serán ejemplos de dichas enzimas polimerizantes. Al final del paso de polimerización, se añadirán el IMPDH junto con los reactivos de IMPDH apropiados. Si la muestra no contiene la secuencia de oligonucleótido diana, entonces la síntesis de oligonucleótido no se realizará y el N-MPA estará libre para inhibir el IMPDH. Si la secuencia diana está presente en la muestra, entonces el N-MPA se incorporará en el oligonucleótido y menos conjugado N-MPA estará disponible para inhibir el IMPDH. La concentración de N-MPA libre será inversamente proporcional a la actividad de IMPDH. Cuanto más se agote el N-MPA libre, mayor será la actividad de IMPDH.

Este ensayo puede utilizarse sobre ambas bases cualitativa y cuantitativa para determinar la presencia de moléculas diana de DNA o RNA particulares. La cantidad de diana presente en la muestra será proporcional a la actividad de IMPDH.

La modulación de la actividad de IMPDH mediante los derivados de MPA puede también aplicarse a la detección de antígenos de proteína. Un polipéptido corto que representa el epítopo o mimotopo de un antígeno mayor puede derivarse, de acuerdo con los métodos conocidos en la materia, para contener un grupo que puede unirse a una molécula de MPA apropiadamente derivada para formar un conjugado polipéptido-MPA (PP-MPA). Véase Amerongen, A.V. et al., Peptide Research 5(5):269-274 (1992).

El ensayo se realiza mezclando una muestra clínica con PP-MPA, anticuerpo o pareja de unión apropiada selectiva para el antígeno de interés, IMPDH y los reactivos apropiados utilizados en el ensayo IMPDH. Si la muestra no contiene el antígeno, el conjugado PP-MPA se unirá al anticuerpo y no estará disponible para inhibir IMPDH. Si la muestra contiene el antígeno diana específico para el que el ensayo está diseñado, el conjugado PP-MPA competirá con el antígeno por el anticuerpo limitado presente. La cantidad de inhibición de IMPDH es proporcional a la cantidad de antígeno libre presente en la muestra. Un ensayo cuantitativo puede generarse representando la concentración de antígeno versus la cantidad de actividad de IMPDH. La cantidad de antígeno presente será inversamente proporcional a la cantidad de actividad de IMPDH.

Se obtendrá un conocimiento más completo de la presente invención mediante la referencia de los siguientes ejemplos no limitantes.

Abreviaturas utilizadas:

ACES	ácido N-[2-acetamido]-2-aminoetanosulfónico
DADOO	1,8-diamino-3,6-dioxa-octano 2,2'-(etilendioxi)bis-etilamina
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
DMF	N,N-dimetilformamida
DMPU	1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona
EDC	1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
HMPA	hexametilfosforamida
MEM	2-metoxietoximetilo
NaHMDS	bis(trimetilsilil)amida sódica
NHS	N-hidroxisuccinimida
RP-HPLC	cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
TAPSO	3-[N-tris-(hidroximetil) metilamino]-2-hidroxipropanesulfonato, Na
TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
TBDPS	tert-butildifenilsilil
tBoc	terc-butoxicarbonilo
TCEP	clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina
THF	tetrahidrofurano

En los ejemplos que siguen, los números en negrita se refieren a la correspondiente estructura en las figuras.

Los reactivos se obtuvieron de Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI; o de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO; a no ser que se indique de otra manera.

Todos los solventes se obtuvieron de J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, y fueron de calidad A.C.S. o para H.P.L.C., o mejor incluso a no ser que se indique de otra manera.

La trietilamina se obtuvo de Fluka Chemical Corp. (Nº Catálogo 90340; pureza; =99,5%)

El ácido trifluoroacético (TFA) se obtuvo de Fluka Chemical Corp. (Nº Catálogo 91703, para espectroscopía UV)

La piridina anhidra y la dimetilformamida (DMF) se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., preempaquetadas en botellas "Sure-Seal™". Todas las adiciones/ sustracciones y manipulación de solventes anhidros se realizaron con jeringuilla/ aguja.

El tetrahidrofurano (THF) se secó por ebullición y destilación a partir de sodio/ benzofenona bajo argón.

El cloruro de metileno se secó por ebullición y destilación a partir de hidruro de calcio bajo argón.

La cromatografía en columna se realizó utilizando gel de sílice de calidad para cromatografía rápida a partir de E.M. Science (Nº de catálogo 9385-9; gel de sílice 60; 230-400 malla ASTM) y bajo una presión positiva de nitrógeno.

La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó utilizando placas de gel de sílice obtenidas a partir de E.M. Science (Nº de catálogo 5715-7; espesor 0,025 cm)

Los solventes mezclados se expresaron como volumen en los porcentajes en volumen. Por ejemplo, 10% MeOH-$CHCl_3$ (o 10% MeOH en $CHCl_3$) es cloroformo que contiene un 10% de metanol en volumen.

A menos que se indique de otra manera, el análisis por RP-HPLC se realizó en un sistema Agilent HP1100 LC/ MS; o un sistema Agilent HP1100 HPLC, ambos configurados con un detector de conjunto de diodos (del inglés "*diode-array*") y una bomba cuaternaria. El análisis LC/ MS se realizó con una columna Vydac 218TP54 (RP-C18; 300Å, 5μ) equipado con un módulo de guardia Phenomenex (Phenomenex KJO-4282/C18 ODS 5 μ), con el flujo cromatográfico portado tras la columna en el detector MS. El MSD utilizado se utilizó en modo ES (+) (electropulverizador; modo positivo). El análisis por HPLC se realizó con una columna Vydac 218TP54 (RP-C18, 300Å, 5 μ) equipada con un módulo de guardia Vydac 218GK54.

A menos que se indique de otra manera, la RP-HPLC preparativa se realizó en un sistema Varian Dynamax (Rainin) utilizando dos bombas con cabeza de titanio SD1 de 2000 psi con un detector de longitud de onda variable Varian Dynamax UV-C. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna de compresión radial modular Varian Dynamax (R00083221C; Microsorb 60-8, C18, 250 x 21,4 mm) equipado con un módulo de guardia (R00083221G; C18, 8 μ).

A menos que se indique de otra manera, la liofilización de las fracciones de HPLC involucra la evaporación de acetonitrilo (u otro cosolvente orgánico) bajo presión reducida, seguido de la congelación del residuo acuoso (por ejemplo, utilizando un baño de enfriamiento de hielo seco/ acetona), seguido por la sublimación del hielo en un liofilizador de la manera habitual.

El espectro de ^{1}H-RMN se obtuvo a 200, 300, o 400 MHz en un instrumento Varian o Bruker.

El espectro de masas se obtuvo a partir de las instalaciones de química física/ analítica de Hoffmann-La Roche (Nutley, NJ), Roche Bioscience (Palo Alto, CA), Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Alemania), Roche Diagnostics Corp 15 (Indianapolis, IN), o del Centro de Nebraska para Espectrometría de Masas, Dept. de química, U. de Nebraska (Lincoln, NE).

El espectro UV se obtuvo de los Laboratorios Robertson Microlit, Madison, NJ. La abreviatura utilizada es: sh, shoulder.

Los datos de combustión microanalítica se obtuvieron de los Laboratorios Robertson Microlit, Madison, NJ.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de reactivo de anticuerpo para el ensayo de ácido micofenólico

Se preparó un litro de un reactivo de anticuerpo, o primer reactivo, como sigue. Aproximadamente 800 ml de agua

desionizada se dispensó en un contenedor y 6,0 gramos de ACES se añadieron y disolvieron. El pH se ajustó a 6,0 con NaOH 2N. Después se añadieron 0,53 gramos de NAD y se disolvieron completamente. A continuación se añadieron 10 ml de anticuerpo monoclonal anti-MPA de ascites. Después se añadieron 0,95 gramos de azida sódica y se disolvieron, y finalmente se añadió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A (GAF Chemicals Corp.) y se disolvió. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada.

Tabla 1: Composición de reactivo de anticuerpo

Reactivo de anticuerpo, pH 6,0 componente	Peso molec.	M	g/l	Función	M final en 150 µl
ACES	182,2	0,0330	6,0	tampón, estabilizador de NAD	0,0163
NAD	663,4	0,0008	0,53	Sustrato de enzima	0,0004
Anti-MPA	-	-	1:100	anticuerpo monoclonal	–
azida Na	65,0	0,0146	0,95	Conservante antimicrobiano	0,0072
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004

El anticuerpo utilizado se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito por Alexander et al. en la publicación de patente PCT WO 96/02004 (1996). Cualquier anticuerpo con especificidad para MPA, ya sea monoclonal o policlonal, puede utilizarse en la práctica de la presente invención. Los anticuerpos monoclonales son preferibles generalmente, no obstante, debido a su facilidad y consistencia de producción.

Ejemplo 2. Preparación de reactivo de enzima para el ensayo de ácido micofenólico

Se preparó un litro de un reactivo de enzima, o segundo reactivo, como sigue. Aproximadamente 800 ml de agua desionizada se dispensó en un contenedor y se añadieron y disolvieron 56,3 gramos de NaTAPSO completamente. Entonces 81,6 gramos de acetato de sodio -3H_2O se añadieron y disolvieron. Después, 1,15 gramos de TCEP se añadieron y disolvieron. Posteriormente 0,319 gramos de IMP se añadieron y disolvieron, después 2,23 gramos de Na_2EDTA se añadieron y disolvieron. Posteriormente 1,0 gramo de SUTTOCIDE A se añadió y disolvió. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada. Aproximadamente 13,4 ml de IMPDH-II recombinante humana se añadieron y disolvieron completamente (lisado de E. coli) para poder lograr un cambio en la absorbancia a 340 nm de 4400 x 10^{-4} durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadieron y disolvieron 0,002 gramos de conjugado ligando-inhibidor (MPA-MPA, Ejemplo 42).

El procedimiento utilizado para la clonación y purificación de IMPDH-II se describe en Carr, S.F. et al., J. Biological 55 Chemistry 268(36):27286-27290 (1993), cuyo contenido se incorpora en este documento por referencia. La clonación de IMPDH también se describe en Collart, F.R. et al., Patente Estadounidense Nº 5,665,583 (1997). El IMPDH de fuentes naturales no está disponible comercialmente. Cualquier fuente natural de IMPDH que pueda inhibirse por MPA, derivado de MPA o inhibidor no competitivo de IMPDH también es adecuado.

La cantidad efectiva de componentes de reactivo es variable dependiendo de las necesidades específicas y puede ajustarse mediante la experimentación simple en laboratorio para encontrar los requisitos de ensayo particulares.

La concentración de ligando-inhibidor se escogió en base al grado de inhibición de IMPDH por el ligando-inhibidor con y sin anticuerpo específico al ligando. La diferencia máxima en el porcentaje de cambio en la inhibición con y sin anticuerpo se escogió para utilizar en el inmunoensayo. Se encontró que en general, una concentración de inhibidor ligeramente inferior a su valor de CI_{50} y una concentración molar de anticuerpo ligeramente inferior a la mitad de la concentración molar de ligando-inhibidor produjo la máxima diferencia en el cambio de porcentaje de la inhibición de IMPDH. Con dos lugares de unión por anticuerpo, el número total de sitios de unión a ligando fue ligeramente inferior a la concentración molar total de ligando-inhibidor. La actividad de enzima posee un efecto ligero en los valores de CI_{50} del ligando-inhibidor. Cuanto inferior sea la actividad de la enzima, inferior será el valor de CI_{50} del ligando-inhibidor. Esto es consistente con Nowak, I. et.al, Therapeutic Drug Monitoring 19, 358-360 (1997). Por lo tanto, la actividad de IMPDH se ajustó para producir el valor de CI_{50} más bajo para el ligando-inhibidor.

Tabla 2: Composición de reactivo de enzima

Reactivo de enzima, pH 8,0 Componente	Peso molec.	M	g/l	Función	M final en 150 µl
Na TAPSO	281,3	0,2	56,3	Tampón	0,1
Acetato de Na-3H_2O	136,1	0,6	81,6	Enzima estabilizador-reduce la agregación enzimática	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	Enzima estabilizador-reduce los grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,002
Na_2 IMP	392,2	0,0008	0,319	Sustrato de enzima	0,0004
Na_2EDTA	372,2	0,006	2,23	Enzima estabilizador - quelante de metales pesados, mantiene reducidos los sulfhidrilos de las cisteínas	0,003
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	Enzima	–
MPA-MPA	581	$3,4x10^{-6}$	0,002	Ligando-inhibidor	$1,7x\ 10^{-6}$

Ejemplo 3. Medición de ácido micofenólico

Se analizó la presencia de MPA en las muestras de plasma humano a las que se ha añadido ácido micofenólico utilizando el método de la presente invención. Se programó un analizador HITACHI 717 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) para dispensar 3 µl de muestra y 150 µl de reactivo de anticuerpo en una cubeta a 37°C, que se mezclaron entonces y se incubaron durante 5 minutos tras los cuales, se añadieron 150 µl de reactivo de enzima y se mezclaron. La diferencia en la absorbancia a 340 nm se calculó a partir de la adición inicial de reactivo de enzima a los 5 minutos tras la adición de reactivo de enzima.

Tabla 3. Actividad IMPDH como función de conjugado ligando-inhibidor, concentración de anticuerpo y analito

Muestra de 3 µl	(MPA µg/ ml)	Reactivo de anticuerpo 150 µl (+/- anti-MPA)	Reactivo de enzima 150 µl (+/- MPA-MPA)	$\Delta A \times 10^{-4}$ @ 340 nm
A	0	-	-	4338
	5	-	-	1939
	10	-	-	541
B	0	-	+	1666
	5	-	+	557
	10	-	+	214
C	0	+ (1:100)	+	3109
	5	+ (1:100)	+	2671
	10	+ (1:100)	+	2135
D	0	+ (1:1000)	+	1957
	5	+ (1:1000)	+	804
	10	+ (1:1000)	+	304
E	0	+ (1:100)	-	4330
	5	+(1:100)	-	4075
	10	+(1:100)	-	3667

La Tabla 3 muestra la actividad de IMPDH como una función del conjugado ligando-inhibidor (MPA-MPA), concentración de anticuerpo MPA y de analito de ácido micofenólico (MPA). Los datos indican que el conjugado ligando-inhibidor posee características inhibidoras útiles necesarias para un inmunoensayo homogéneo; esto es, el conjugado ligando-inhibidor está unido por ambos IMPDH y su anticuerpo específico, y esta unión es un evento mutuamente exclusivo. Con el grupo de muestras A, los reactivos no contenían anticuerpo o ligando-inhibidor y produjeron máxima actividad IMPDH. Con el grupo de muestras B, el reactivo de enzima contenía inhibidor de ligando y se utilizó para mostrar el efecto de inhibidor de ligando sobre la actividad de IMPDH. El grupo de muestras C se preparó para mostrar la modulación de la actividad de IMPDH mediante MPA cuando ambos anticuerpos y ligando-inhibidor están presentes. En el grupo de muestras D, no hubo presencia suficiente de anticuerpo en el reactivo de anticuerpo para unir MPA o conjugado MPA-MPA y muestra el efecto de insuficiente concentración de anticuerpo. En el grupo de muestras E, hay suficiente anticuerpo presente para unir la mayor parte de MPA y muestra el efecto de la unión de anticuerpo sobre el MPA solo. Se comparan estos resultados con los resultados obtenidos sin anticuerpo observados con el grupo de muestras A.

Ejemplo 4. Preparación de enlazante bromo-isoprenilo, MPA-éster metílico y 3-ß-amino-digoxigenina

El enlace bromo-isoprenilo (1) se preparó de acuerdo con el procedimiento publicado por Stephanie E. Sen y Gregory J. Ewing en J. Org. Chem. 62, 3529-3536 (1997).

El éster metílico de MPA (2) se preparó de acuerdo con el procedimiento publicado por William A. Lee, Leo Gu, Andrew R. Miksztal, Nancy Chu, Kwan Leung y Peter H. Nelson en Pharmaceutical Research 7,161-166 (1990).

3-ß-Amino-digoxigenina se preparó de acuerdo con el procedimiento publicado en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 9,771-774 (1999).

Ejemplo 5. Preparación del éster metílico de 5'-isoprenil[OTBDPS]-MPA (3)

Una solución de 4,02 ml (4,01 mmol) de bis (trimetilsilil) amida sódica, solución 1M en tetrahidrofurano (THF), se enfrió en un baño de hielo seco/ acetona bajo una atmósfera de argón. A esta mezcla de reacción se le añadió por goteo una solución de 600 mg (1,79 mmol) del éster metílico de MPA (2) en 7 ml de THF anhidro. La solución resultante se dejó en agitación a -78°C durante 30 minutos y se añadió una solución de 84 mg (0,46 mmol) de hexametilfosforamida (HMPA) en 2 ml de THF. La mezcla de reacción se dejó en agitación 15 minutos a -78°C y se añadió una solución de 840 mg (2,08 mmol) de enlazante bromoisoprenilo (1) en 2 ml de THF por goteo. Se retiró el baño de hielo seco y la reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo de 20 minutos. La mezcla de reacción se paró con 5 ml de cloruro de amonio saturado. Se añadió a la mezcla de reacción 100 ml de agua y se extrajo con 200 ml de acetato de etilo. La capa orgánica se separó y la parte acuosa se re-extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). La parte orgánica combinada se lavó con 100 ml de salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando acetato de etilo al 20% en hexano para proporcionar 501 mg (43%, 0,76 mmol) de éster metílico de 5'-isoprenil[OTBDPS]-MPA (3). Compatible con ^{1}H-RMN. LR-FAB MS: m/z 656

Ejemplo 5A. Preparación de MPA-isoprenil alcohol (racémico, 3A)

A una solución de 180 mg (0,27 mmol) de 3 en 18 mL de THF recién destilado se le añadió 760 mL de una solución 1M de fluoruro de tetrabutilamonio a 0°C y la solución resultante se dejó en agitación a 0°C durante 1h y a temperatura ambiente durante 18 horas. A la mezcla de reacción se le añadió 12 mL de solución 0,5 M de HCl y después se concentró para eliminar el THF tanto como fue posible. Al residuo se le añadió 50 mL de agua y esto se extrajo con 3 x 125 mL de acetato de etilo. La capa combinada de acetato de etilo se lavó con 2 x 100 mL de agua, se secó con (Na_2SO_4 anh.) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en columna en gel de sílice utilizando acetato de etilo al 80% en hexano para proporcionar 85 mg (0,20 mmol, 74%) de x.

A 34 mg (0,081 mmol) de x se le añadió 470 mL de THF recién destilado y 470 mL de metanol seguido por 72 mg de dihidrato de hidróxido de litio en 1 mL de agua. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró bajo presión reducida. Esta se diluyó con 20 mL de agua y el pH se ajustó a 6 utilizando ácido fosfórico. La capa acuosa se extrajo con 3 x 20 mL de cloroformo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en columna en gel de sílice utilizando metanol al 40% en acetato de etilo para proporcionar 10 mg (0,024 mmol, 31%) de 3A como un sólido blanco. La ^{1}H-RMN es compatible. LR-FAB MS: M+Na 427.

Ejemplo 5B. Preparación de MPA-isoprenil alcohol (quiral, enantiómero R) 3B

La MPA-imida de oxazolidinona (xi) se fabricó a partir de ácido micofenólico (MPA) mediante el método de Rohloff et al. (J.C. Rohloff, J.O. Gardner y R.W. Towne, Tetrahedron Lett., 1995, 36(43), 7803-7806).

Un frasco de tipo kjedahl secado al horno se cargó con una solución de hexametildisilazida sódica (Aldrich; 0,876 mL de una solución 1 M en THF) y el frasco y el contenido se enfrió a -78°C (baño de hielo seco /acetona) bajo argón con agitación durante 10 min. Mientras se mantuvo el enfriamiento, se añadió una solución de MPA-oxazolidinona (xi, 200 mg, 0,417 mmol) en THF seco (1,5 mL total) por goteo mediante una jeringuilla y, tras 10 min., se añadió hexametilfosforamida seca (HMPA, 0,10 mL; destilada a partir de hidruro de calcio). Tras 20 min. se añadió una solución del enlazante bromo-isoprenilo (1, 202 mg, 0,50 mmol) en THF seco (1 mL). Tras agitar a -78°C durante unos cuantos minutos la reacción se dejó calentar a 10°C durante 3,5 horas. El análisis por TLC indicó el consumo de los materiales de partida y un producto principal junto con pequeñas cantidades de otros. La reacción se paró con cloruro de amonio acuoso sat. y se acidificó con un poco de HCl 0,1 N, se extrajo dos veces con acetato de etilo (EtOAc), las capas orgánicas se lavaron con HCl 0,1 N, agua, NaCl acuosa medio sat., NaCl acuosa sat., (Na_2SO_4) seca, se filtró y se evaporó para proporcionar 378 mg de un sólido. El material se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (50 g) preempaquetada en EtOAc-hexano al 30%, eluyendo con el mismo solvente seguido de EtOAc-hexanos al 50%. Las fracciones que contienen el producto principal se combinaron y se evaporaron para proporcionar el producto (xii, 103 mg, 31%), asignado como el isómero R mediante analogía con la literatura (Rohloff et al., ver más arriba). La ^{1}H-RMN indicó el producto deseado, con trazas de una impureza no relacionada con MPA

(mediante UV). RP-HPLC [C18: Vydac218TP54; columna quiral: Chiralcel® OD™-RH (Chiral Technologies Inc., Exton, PA, y Daicel Chemical Industries, Japón)] indicando un producto de isómero evidente.

En otro experimento similar, pero utilizando dimetiltetrahidropirimidinona (DMPU) en lugar de HMPA, la mezcla de reacción tras el procedimiento de síntesis anterior se purificó mediante una cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyendo con 15%, luego 30% de EtOAc hexanos), seguido por TLC preparativa (20 x 20 cm x 0,025 cm espesor de sílice; eluyendo con EtOAc-hexanos-MeOH (20-80-2)), seguido después por RP-HPLC [Chiralcel OD-RH, reacciones múltiples, isocrático 80:20 acetonitrilo/ agua (0,1 % CF_3COOH), tasa de flujo 0,5 mL] para proporcionar el producto purificado (xii) como un sólido tras la liofilización. ^{1}H-RMN: compatible e idéntica con el espectro previo. LR(+)FAB MS: M+Na 824, M-H 800, M-C_4H_9 744. HR(+)ES MS: Calculado M+Na 824,3589, Observado 824,3600.

A una solución agitada de (xii, 63 mg) en THF seco (3 mL) bajo argón y se enfrió en un baño de hielo-agua se le añadió una solución de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF (Aldrich; 3 00 mL de una solución 1M; ~ 4 eq. mol.). Tras 2 horas la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente, seguido por análisis por TLC, que mostró el consumo de los materiales de partida fue casi completo y no cambió tras 4,5 horas. La reacción se concentró bajo presión reducida, el residuo se repartió entre EtOAc y HCl 0,1 N, los orgánicos se lavaron con HCl 0,1 N, agua, NaCl sat. acuoso, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron hasta la sequedad. El residuo se purificó mediante TLC preparativa (20 x 20 cm x 0,025 cm espesor de sílice), se eluyó con $CHCl_3$-hexanos-MeOH (50-50-5), para proporcionar, a partir de la banda del producto principal, el producto (xiii, 24 mg, 55%) como un sólido /cristal. ^{1}H-RMN: compatible.

En otro experimento, el tratamiento de ~10 mg de (xii) con TBAF en THF de una forma similar al descrito anteriormente y un procedimiento de síntesis similar proporcionó un material que se purificó dos veces mediante TLC preparativa (Primer plaqueo: eluyendo con 50% EtOAc-hexanos; Segundo plaqueo: eluyendo con 60% de EtOAc-hexanos) para proporcionar, a partir de la banda principal, purificado (xiii, 3 mg). ^{1}H-RMN: compatible, idéntico al espectro anterior. Quiral RP-HPLC (Chiralcel OD-RH): un pico de isómero evidente. LR(+)FAB MS (matriz: 3-NBA+Na): M+Na 586, M-H+2Na 608. HR(+)FAB MS: Calculado M+Na 586,2417, Observado 586,2410.

A una solución de (xiii, 15 mg, 0,0266 mmol) en THF seco (2 mL) se enfrió en un baño de hielo se le añadió una solución de hidróxido de litio (4,5 mg, ~ 4 eq. mol.) en agua (0,24 mL) que contiene peróxido de hidrógeno (Sigma; 16,3 mL de una solución al 30% de peso/ peso en agua, equivalente a ~ 5,4 mg de sustancia actual, ~ 6 eq. mol.). La reacción se agitó bajo argón mientras se mantuvo el frío durante 2 horas, después se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. El análisis por RP-HPLC indicó que la reacción se completó. El THF se eliminó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre EtOAc y HCl 0,1 N y se añadió una pequeña cantidad (punta de espátula) de sulfito sódico. La mezcla se agitó bien, las fases se separaron, los orgánicos se lavaron con HCl 0,1 N, agua, NaCl sat. acuoso, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron hasta la sequedad. El residuo se purificó mediante TLC preparativa (20 x 20 cm x 0,025 cm espesor de sílice), eluyendo con MeOHCHCl_3 al 10%, para proporcionar a partir de la banda de producto principal el producto deseado (3B, 8 mg, 74%) como una espuma colapsada blanquecina. ^{1}H-RMN: compatible. LC/ MS: M+Na 427,1, M-OH 387,1.

Ejemplo 6. Preparación de éster metílico de 5'-isopren[OTBDPS]-MPA[OMEM] (4)

Una solución de 240 mg (0,36 mmol) de (3) en 5 ml de diclorometano seco se enfrió en un baño de hielo. A la mezcla de reacción se le añadió 76 ml (0,433 mmol) de N,N-diisopropiletilamina seguido de 42 ml (0,36 mmol) de cloruro de 2-metoxietoximetilo. La mezcla se dejó agitar en un baño de hielo durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se diluyó con 15 ml de diclorometano. La fase orgánica se lavó con 3 x 20 ml de agua, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando hexano al 60% en acetato de etilo para proporcionar 175 mg (0,23 mmol, 64%) de (4).

Ejemplo 7. Preparación de éster metílico de 5'-isoprenil[OH]-MPA[OMEM] (5)

Una solución de 1,09 g (1,46 mmol) de (4) en 40 ml de THF se enfrió a 0 °C. A esta solución enfriada se le añadió 4,37 ml (4,35 mmol) de fluoruro de tetrabutilamonio (solución 1M en THF) bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó en agitación a 0°C durante 1,5 horas y 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se paró con 5 ml de agua y se concentró. La mezcla de reacción se diluyó con 75 ml de diclorometano y se lavó con 3 x 75 ml de agua, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando acetato de etilo al 80% en hexano para proporcionar 408 mg (0,806 mmol, 55%) de (5). ^{1}H-RMN compatible. LR-FAB MS: m/z 506

Ejemplo 8. Preparación de L-tiroxina[N-tBoc] (6)

A una mezcla agitada magnéticamente de 4,5 g (5,8 mmol) de L-tiroxina, 18 ml de DMF, 5,85 ml de NaOH 1N, 495 mg de $NaHCO_3$ y 18 ml de agua. A esta suspensión se le añadió 1,28 g (5,8 mmol) de di-t-butil dicarbonato en 18 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción resultante se dejó en agitación durante 4 horas y después se concentró bajo presión reducida a temperatura ambiente. Al residuo se le añadió 45 ml de metanol y el material no disuelto se

eliminó por filtración. Al filtrado se le añadió HCl 1N (20 ml) hasta completar la precipitación. El sólido se filtró y se secó al aire para proporcionar 4,2 g (4,78 mmol, 82%) de L-tiroxina (N-tBoc, 6).

Ejemplo 9. Preparación de L-tiroxina(N-tBoc)-amidoetilenamina (7)

A 500 mg (0,57 mmol) de L-tiroxina (N-tBoc, 6) se añadió 15 ml de DMF anhidro seguido por 149 mg (1,29 mmol) de N-hidroxisuccinimida y 283 mg 1,47 mmol) de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Este éster activado se utilizó in situ en el siguiente paso.

A 5,5 ml de piridina anhidra se añadió 1,5 ml (22 mmol) de etilendiamina. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos y la solución previamente realizada de éster activado con tiroxina preparado in situ se añadió por goteo a esta solución. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante un periodo de 48 horas. La mezcla de reacción se concentró y se añadió 100 ml de solución saturada de Na_2CO_3. El sólido se eliminó por filtración y se lavó con 100 ml de agua. Este sólido bruto se purificó mediante cromatografía en columna utilizando 50% de cloroformo en metanol para proporcionar 250 mg (0,27 mmol, 48%) de (7).

Ejemplo 10. Preparación de conjugado del éster metílico de 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina(N-tBoc)]-MPA[OMEM] (8)

A 25 mg (0,049 mmol) de (5) se le añadió 1 ml de THF seguido de 12,6 mg (0,046 mmol) de carbonato de N,N'-disuccinimidilo y 20 ml de trietilamina. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante18 horas para proporcionar el correspondiente carbonato de N-hidroxisuccinimidilo.

Se disolvió L-tiroxina-[N-tBoc]-amidoetilenamina (7, 22mg, 0,023 mmol) en 1 ml de DMF anhidro y se añadió 100 ml de trietilamina. A esta solución se añadió la solución de carbonato de MPA-N-hidroxisuccinimidilo previamente preparada (generada in situ) por goteo. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y se concentró en el evaporador rotatorio. El residuo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) utilizando un sistema de gradiente agua/ acetonitrilo que contiene 0,1% de ácido trifluoroacético. Se combinaron las fracciones que contienen producto, el acetonitrilo se evaporó y la mezcla restante se liofilizó para proporcionar 24 mg (0,016 mmol, 34%) de (8). ^{1}H-RMN compatible. HR-ES(+) MS: Calculado M+Na 1474,0173, Observado 1474,0176

Ejemplo 11. Preparación de conjugado de 5'-(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina(N-tBoc)]-MPA[OMEM] (9)

A 22 mg (0,015 mmol) de éster metílico de 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina(N-tBoc)]-MPA[OMEM] (8) se le añadió 2 ml de metanol y una solución de 40 mg (1,6 mmol) de hidróxido de litio en 1 ml de agua. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 días y se concentró en el evaporador rotativo. A la mezcla de reacción se le añadió 2 ml de agua y el pH se ajustó a 6 utilizando ácido fosfórico diluido. La reacción se concentró hasta la sequedad y se añadió 100 ml de metanol. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante RP-HPLC preparativa (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) utilizando un sistema de gradiente de agua /acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1%. Se combinaron las fracciones que contienen producto, el acetonitrilo se evaporó y la mezcla restante se liofilizó para proporcionar 11 mg (0,007 mmol, 52%) de (9).

Ejemplo 12. Preparación de conjugado de 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina]-MPA (11)

A 5 mg (0,003 mmol) de conjugado de éster metílico de 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina(N-tBoc)]-MPA[OMEM] (9) se añadió 1,5 ml de diclorometano y la solución se enfrió a 0 °C. A esta solución se añadió una solución enfriada con hielo de 200 ml de ácido trifluoroacético al 50% en diclorometano en dos porciones a un intervalo de 5 minutos. La mezcla se dejó en agitación en un baño de hielo durante otros 15 minutos. Esto se concentró bajo presión reducida. La formación de producto se monitorizó mediante RP-HPLC analítica (C-18, Vydac 4,6 mm x 250 mm) utilizando un sistema de gradiente de agua/ acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1%. La reacción se re-sometió a un tratamiento con ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción bruta se re-disolvió en 1,5 ml de diclorometano y la solución se enfrió a 0 °C. A esta solución se añadió una solución enfriada con hielo de 200 ml de ácido trifluoroacético al 50% en diclorometano en dos porciones a un intervalo de 5 minutos. La mezcla se dejó en agitación a 0°C durante 25 minutos. La mezcla de reacción se concentró en el evaporador rotativo y después en la bomba de alto vacío. La formación de producto se monitorizó mediante RP-HPLC analítica (C-18, Vydac 4,6 mm x 250 mm) utilizando un sistema de gradiente de agua/ acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1 %. Los resultados indicaron que la reacción es una mezcla de conjugado que contiene principalmente el MEM-desprotegido 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina(N-tBoc)]-MPA (10) con algún producto (11).

El producto anterior se re-sometió de nuevo al tratamiento de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción anterior se trató con 2 ml de diclorometano y se enfrió en un baño de hielo. A la mezcla se añadió una solución enfriada con hielo de 600 ml de ácido trifluoroacético al 50% en diclorometano en tres porciones a un intervalo de 5 minutos. La

mezcla se dejó en agitación en el baño de hielo durante otros 25 minutos. La mezcla se concentró bajo presión reducida. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC semi-preparativa (C-18, Vydac, 10 mm x 250 mm) utilizando un sistema de gradiente de agua/ acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% (3 ml/ min.). Se combinaron las fracciones que contienen el producto, se evaporó el acetonitrilo, y la mezcla restante se liofilizó para proporcionar 1,8 mg (0,0013 mmol, 45%) de (11). ^{1}H-RMN compatible, LC/ MS: M+Na 1271,8

Ejemplo 13. Preparación de éster de MPA t-butilo (12)

El ácido micofenólico (860 mg, 2,68 mmol) se disolvió en una solución de 1,4-dioxano que contiene 700 ml de H_2SO_4 concentrado. La solución se transfirió a una botella de presión y esta se enfrió en hielo. Se vertió isobutileno (20 ml) en la solución de ácido micofenólico. La botella de presión se tapó y se agitó magnéticamente muy despacio durante 2 días a temperatura ambiente. La mezcla se dejó enfriar en hielo seco /acetona y la presión se liberó lentamente. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se diluyó con 150 ml de acetato de etilo. La parte acuosa se separó y se extrajo con 3 x 100 ml de acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua, 100 ml de $NaHCO_3$ saturado seguido de 100 ml de agua y se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando hexano al 80% en acetato de etilo para proporcionar 590 mg (1,63 mmol, 60%) de éster de MPA t-butilo (12).

Ejemplo 14. Preparación de éster de 5'-etoxicarbonilmetil-MPA t-butilo(13)

Una solución de 3,2 ml (3,19 mmol) de bis (trimetilsilil)amida sódica (solución 1,0 M en THF) se enfrió en un baño de hielo seco/ acetona a -78 °C. bajo una atmósfera de argón. A esta solución enfriada se añadió 0,32 ml (2,64 mmol) de DMPU y se dejó agitar a -78°C durante 15 minutos. Una solución de 398 mg (1,10 mmol) de éster de MPA t-butilo (12) en 5 ml de THF recién destilado se añadió por goteo a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se dejó en agitación a -78°C durante 30 minutos y se añadió 0,18 ml (1,61 mmol) de bromoacetato de etilo. La mezcla resultante se agitó a -40°C durante 3 horas y 0°C durante 1 hora. La reacción se paró con 10 ml de cloruro de amonio saturado y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente. Se añadieron 80 ml adicionales de cloruro de amonio saturado y la parte acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 80 ml). Las capas orgánicas se combinaron, secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, primero eluyendo utilizando 80% de hexano en acetato de etilo y después 50% de acetato de etilo en hexano para proporcionar 330 mg de producto que contiene impurezas. Este se re-purificó mediante RP-HPLC preparativa (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) utilizando un sistema de gradiente de agua/ acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1%. Se combinaron las fracciones que contienen el producto, se evaporó el acetonitrilo, y la mezcla restante se liofilizó para proporcionar 163 mg (0,35 mmol, 32%) de (13). ^{1}H-RMN compatible, HR-FAB MS: Calculado para M+Na 485,2151, Observado 485,2140

Ejemplo 15. Preparación de éster de 5'-carboximetil-MPA t-butilo (14)

Una solución de 141mg (0,30 mmol) de (13) se preparó en 41,1 ml de DMSO. Este se diluyó con 81 ml de tampón fosfato potásico 0,1M a pH 7,0 y se añadió 306 ml de esterasa (a partir de hígado de cerdo, Roche Diagnostics, suspensión 10 mg/ ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 días y se filtró. El filtrado se purificó utilizando RP-HPLC preparativa (WATERS DELTAPAK C-18 50 x 250 mm, sistema de agua/ acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1%). Se combinaron las fracciones que contienen el producto, se evaporó el acetonitrilo, y la mezcla restante se liofilizó para proporcionar 76 mg (0,17 mmol, 57%) de éster de 5'-carboximetil-MPA t-butilo (14).

Ejemplo 16. Preparación de conjugado de éster de 5'-(digoxigenin-3-il-ß-amidometil)-NTA t-butilo (15)

Se disolvió éster de 5'-carboximetil-MPA t-butilo (20 mg, 46 mmol) en 193 ml DMF. A esta mezcla de reacción se le añadieron 7,95 mg (69 mmol) de N-hidroxisuccinimida y 11,4mg (55,2 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadieron otros 2,65 mg (23 mmol) de N-hidroxisuccinimida y 2,85 mg (13,8 mmol) de DCC disueltos en 55 ml de DMF y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una solución de 23,2 mg (46 mmol) de 3-ß-amino-digoxigenina en 63,8 ml (460 mmol) de trietilamina y 120 ml of DMF. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y se evaporó para proporcionar 68 mg de producto bruto (15). Este se utilizó en el siguiente paso sin una posterior purificación.

Ejemplo 17. Preparación de conjugado de 5'-(digoxigenin-3-il-ß-amidometil)-MPA (16)

El producto bruto del éster de 5'-(digoxigenin-3-il-ß-amidometil)-MPA t-butilo (15) se disolvió en 3 ml de diclorometano. A la mezcla de reacción se añadió 3 ml de ácido trifluoroacético y la solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos exactos. La solución se evaporó entonces y el residuo se purificó inmediatamente como se describe a continuación:

El residuo se disolvió en 1,5 ml de metanol e inmediatamente se purificó utilizando RP-HPLC semi-preparativa (Vydac C-18 300 Å 10 μm 22 x 250 mm, sistema de agua /acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1%)

para proporcionar 7,3 mg de isómero A (16A) y 7,4 mg de isómero B (16B).

Tabla 4: Características de los isómeros

	Isómero A	Isómero B
RP-HPLC (Vydac C-18 5 μm 300 Å 4,6 250 mm; Gradiente: 0 a 100% acetonitrilo + 0,1 % TFA en 50 minutos)	93% (UV 226 nm) x Rt = 25,09 min.	87% (UV 226 nm) Rt = 25,34 min.
MS	ok	ok
^{1}H-RMN	compatible	compatible

Ejemplo 18. Preparación de reactivo de anticuerpo para el ensayo de tiroxina

Un litro de un reactivo de anticuerpo, o primer reactivo, se preparó como sigue. Aproximadamente 800 ml de agua desionizada se dispensó en un contenedor y se añadieron 6,0 gramos de ácido N-[2-acetamido]-2-aminoetanosulfónico ACES y se disolvieron. El pH se ajustó a 6,0 con NaOH 2N. Después 0,663 gramos de NAD se añadieron y disolvieron por completo. Después se añadieron y se disolvieron 0,95 gramos de azida sódica, y finalmente se añadió y disolvió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada. Finalmente, se añadieron 10 miligramos de anticuerpo monoclonal anti-L-tiroxina.

Tabla 5: Composición del reactivo de anticuerpo

Reactivo de anticuerpo, pH 6,0 Componente	Peso molec.	M	g/l	Función	M final 150 μl
ACES	182,2	0,0330	6,0	Tampón, estabilizador de NAD	0,0163
NAD	663,4	0,001	0,6634	Sustrato de enzima	0,0005
Anti-L-tiroxina	150,000	-	0,010	Anticuerpo monoclonal	-
Azida Na	65,0	0,0146	0,95	Conservante anti-microbiano	0,0072
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante anti-microbiano	0,004

El anticuerpo utilizado se preparó de acuerdo con procedimientos fácilmente disponibles y conocidos por los expertos en la materia a la que la presente invención pertenece. Cualquier anticuerpo con especificidad para la tiroxina, ya sea monoclonal o policlonal, puede utilizarse en la práctica de la presente invención. Los anticuerpos monoclonales son preferibles en general, debido a su facilidad de producción y consistencia.

Ejemplo 19. Preparación de reactivo de enzima para el ensayo de tiroxina

Un litro de un reactivo de enzima, o segundo reactivo, se preparó como sigue. Aproximadamente 800 ml de agua desionizada se dispensó en un contenedor y 168,8 gramos de NaTAPSO se añadieron y se disolvieron por completo. Posteriormente, 1,15 gramos de TCEP se disolvieron. Después 31,4 gramos de IMP se disolvieron, después 2,23 gramos de Na_2EDTA se disolvieron. A continuación se disolvió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada. Se añadió suficiente IMPDH-II recombinante humano (como un precipitado al 35% de sulfato de amonio de un sobrenadante de lisado de *E. coli*) y se disolvieron por completo para lograr un cambio en la absorbancia a 340 nm de 780 x 10^{-4} a los 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadieron y se disolvieron 0,0005 gramos de conjugado ligando-inhibidor 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina]-MPA (11).

Tabla 6: Composición de reactivo de enzima

Reactivo de enzima, pH 8,0 Componente	Peso Molec.	M	g/l	Función	M final en 150 µl
Na TAPSO	281,3	0,6	168,8	Tampón, estabilizador enzimático que reduce la agregación de la enzima	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	Estabilizador enzimático que reduce los grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,002
Na_2 IMP	392,2	0,08	31,4	Sustrato enzimático, estabilizador enzimático	0,04
Na_2EDTA	372,2	0,006	2,23	Estabilizador enzimático quelante de metales pesados, mantiene reducidos los grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,003
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	Enzima	-
5'-[(isopreniloxicarbonil-aminoetilenamido)-tiroxina]-MPA	1363,44	$3,7x10^{-7}$	0,0005	Ligando-inhibidor	$1,8x10^{-7}$

Ejemplo 20. Medida de la tiroxina

En muestras de salina a las que se había añadido L-tiroxina se analizó la tiroxina utilizando el método de la presente invención. Las muestras se prepararon resuspendiendo L-tiroxina (Sigma Chemical) en salina, que se disolvió mediante la adición gota a gota de NaOH 1 N, y luego se diluyó con salina para conseguir las concentraciones finales de 100, 250, 500 y 1000 ng/ ml.

Un analizador HITACHI 917 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) se programó para dispensar 3 µl de muestra y 150 µl de reactivo con el anticuerpo en una cubeta a 37°C, que entonces se mezclaron y se incubaron durante 5 minutos tras los cuales se añadieron 150 µl de reactivo con la enzima y se mezcló. Se calculó la tasa a 340 nm (mA/ min.) durante un periodo de 3 minutos 13 segundos a 4 minutos 42 segundos (ventana de lectura 29-34) tras la adición del reactivo con la enzima. Los resultados obtenidos ained se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 21. Preparación del reactivo con el anticuerpo para el ensayo con digoxigenina

Se preparó un litro de reactivo de un anticuerpo, o primer reactivo, como sigue. Se dispensaron aproximadamente 800 ml de agua desionizada en un recipiente y se añadieron 6,0 gramos de ACES y se disolvieron. El pH se ajustó a 6,0 con NaOH 2 N. Luego se añadieron 0,53 gramos de NAD y se disolvieron completamente. Entonces se añadieron 0,95 gramos de azida sódica y se disolvieron, y finalmente se añadió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A y se disolvió. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada. Finalmente, se añadieron 25 miligramos de anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina.

Tabla 7: Composición del reactivo de un anticuerpo

Reactivo con anticuerpo, pH 6,0 Componente	Peso molecular	M	g/ l	Función	M final en 150 µl
ACES	182,2	0,0330	6,0	Tampón, estabilizante de NAD	0,0163
NAD	663,4	0,0008	0,53	Sustrato de la enzima	0,0004
Anti-digoxigenina	150,000		0,025	Anticuerpo monoclonal	
azida Na	65,0	0,0146	0,95	Conservante antimicrobiano	0,0072
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004

El anticuerpo utilizado está disponible a nivel comercial (Roche Nº Cat. 1333062). Sin embargo, puede utilizarse cualquier anticuerpo con especificidad por la digoxigenina, ya sea monoclonal o policlonal, en la práctica de la presente invención. Los anticuerpos monoclonales generalente son preferibles, sin embargo, a causa de su producción fácil y consistente.

Ejemplo 22. Preparación de un reactivo de enzima para un de ensayo de digoxigenina

Se preparó un litro de reactivo de enzima, o segundo reactivo, como sigue. Se dispensaron aproximadamente 800 ml de agua desionizada en un recipiente y se añadieron 56,3 gramos de TAPSO Na y se disolvieron completamente.

Luego se añadieron 81,6 gramos de acetato sódico - $3H_2O$ y se disolvieron. Luego, se disolvieron 1,15 gramos de TCEP. A continuación se disolvieron 0,319 gramos de IMP, luego se disolvieron 2,23 gramos de EDTA disódico. A continuación se disolvió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada. Se añadió una cantidad suficiente de IMPDH-II humano recombinante (como un precipitado con sulfato de amonio al 35% de un sobrenadante de lisado de E. coli) y se disolvió completamente para conseguir un cambio en la absorbancia a 340 nm de 1280 x 10^{-4} a lo largo de 5 minutos a 37°C. A continuación se añadieron 0,001 gramos de inhibidor ligando (4'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA o 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA) y se disolvieron.

Tabla 8: Composición de un reactivo con enzima

Reactivo con enzima, pH 8,0 Componente	Peso molecular	M	g/ l	Función	M final en 150 µl
TAPSO Na	281,3	0,2	56,3	Tampón	0,1
Acetato sódico - $3H_2O$	136,1	0,6	81,6	Estabilizante de la enzima – reduce la agregación de la enzima	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	Estabilizante de la enzima – reduce los grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,002
IMP disódico	392,2	0,0008	0,319	Sustrato de la enzima	0,0004
EDTA disódico	372,2	0,006	2,23	Estabilizante de la enzima – quelante de metales pesados, mantiene los grupos sulfhidrilo de la cisteína reducidos	0,003
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	Enzima	-
4'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA	939,12	1,07 x 10^{-6}	0,001	Inhibidor ligando	5,3x10^{-7}
5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA	939,12	1,07 x 10^{-6}	0,001	Inhibidor ligando	5,3x10^{-7}

Ejemplo 23. Medida de la digoxigenina

En las muestras de salina a las que se había añadido digoxigenina se analizó la presencia de digoxigenina utilizando el método de la presente invención. La digoxigenina (Sigma chemical) se disolvió en primer lugar en DMSO al 100% y luego se añadió a plasma humano normal para alcanzar concentraciones de 0,5, 1,0, 5,0 y 10,0 mg/ ml. Un analizador HITACHI 717 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) se programó para dispensar 20 µl de muestra y 150 µl de reactivo de anticuerpo en una cubeta a 37°C, que luego se mezclaron e incubaron durante 5 minutos, tras lo que se añadieron 150 µl de reactivo con enzima y se mezcló. La diferencia en la absorbancia a 340 nm se calculó a partir de la adición inicial de reactivo de enzima a lo largo de 5 minutos tras la adición del reactivo con la enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

Este ejemplo muestra que los conjugados preparados en la posición 4' o la 5' pueden utilizarse en la presente invención.

Ejemplo 24. Preparación del reactivo con anticuerpo para el ensayo de digoxigenina

Se preparó un litro de reactivo de anticuerpo, o primer reactivo, como sigue. Se dispensaron aproximadamente 800 ml de agua desionizada en un recipiente y se añadieron 6,0 gramos de ACES y se disolvieron. El pH se ajustó a 6,0 con NaOH 2 N. Luego se añadieron 0,663 gramos de NAD y se disolvieron completamente. Luego se añadieron 0,95 gramos de azida sódica y se disolvieron, y finalmente se añadió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A y se disolvió. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada. Finalmente, se añadieron 10 o 15 miligramos de anticuerpo monoclonal anti-digitoxina.

Tabla 9: Composición del reactivo con anticuerpo.

Reactivo con anticuerpo, pH 6,0 Componente	Peso molecular	M	g/ l	Función	M final en 150 µl
ACES	182,2	0,0330	6,0	Tampón, estabilizante de NAD	0,0163
NAD	663,4	0,001	0,6634	Sustrato de la enzima	0,0005
Anti-digitoxina	150,000	-	0,010 o 0,015	Anticuerpo monoclonal	-
Azide sódica	65,0	0,0146	0,95	Conservante antimicrobiano	0,0072
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004

Con el isómero B de la digoxigenina se utilizó menos anticuerpo monoclonal ya que se observó una mayor sensibilidad del ensayo con este inhibidor con menos anticuerpo monoclonal. Esto puede ser debido a una mejora de la competición entre la unión de IMPDH y la unión del anticuerpo monoclonal con este inhibidor. Esto podría ser el resultado de un aumento de la afinidad del inhibidor por el IMPDH y el anticuerpo monoclonal.

Ejemplo 25. Preparación del reactivo con enzima para el ensayo de la digoxigenina

Se preparó un litro de reactivo de enzima, o segundo reactivo, como sigue. Se dispensaron aproximadamente 800 ml de agua desionizada en un recipiente y se añadieron 168,8 gramos de TAPSO Na y se disolvieron completamente. A continuación se disolvieron 1,15 gramos de TCEP. A continuación se disolvieron 31,4 gramos de IMP, luego se disolvieron 2,23 gramos de EDTA disódico. A continuación se disolvió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada. Se añadió una cantidad suficiente de IMPDH-II humano recombinante (como un precipitado con sulfato de amonio al 35% de un sobrenadante de lisado de E. coli) y se disolvió completamente para conseguir un cambio en la absorbancia a 340 nm de 3300 x 10^{-4} a lo largo de 5 minutos a 37°C. A continuación se añadieron 0,0002 gramos de inhibidor ligando (5'-[(digoxigenin-3-il)-ß-amidometil]-MPA, isómero A o 5'-[(digoxigenin-3-il)-ß-amidometil]-MPA, isómero B) y se disolvieron. Alternativamente se añadieron 0,0005 gramos de inhibidor ligando (5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA, racémico) y se disolvieron.

Tabla 10: Composición de un reactivo con la enzima

Reactivo con enzima, pH 8,0 Componente	Peso molecular	M	g/ l	Función	M final en 150 µl
TAPSO Na	281,3	0,6	168,8	Tampón, estabilizante de la enzima – reduce la agregación de la enzima	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	Estabilizante de la enzima – reduce los grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,002
IMP disódico	392,2	0,08	31,4	Sustrato de la enzima, estabilizante de la enzima	0,04
EDTA disódico	372,2	0,006	2,23	Estabilizante de la enzima – quelante de metales pesados, mantiene los grupos sulfhidrilo de la cisteína reducidos	0,003
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	Enzima	-
5'-[(digoxigenin-3-il)-ß-amidometil]-MPA (isómero A)	749,91	2,7 x 10^{-7}	0,0002	Inhibidor ligando	1,3 x 10^{-7}
5'-[(digoxigenin-3-il)-ß-amidometil]-MPA (isómero B)	749,91	2,7 x 10^{-7}	0,0002	Inhibidor ligando	1,3 x 10^{-7}
5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (racémico)	939,12	5,3 x 10^{-7}	0,0005	Inhibidor ligando	2,7 x 10^{-7}

Ejemplo 26. Medida de la digoxigenina

En las muestras de salina a las que se había añadido digoxigenina se analizó la presencia de digoxigenina utilizando el método de la presente invención. La digoxigenina (Sigma Chemical) se disolvió en primer lugar en DMSO al 100%

y luego se añadió a la salina para alcanzar concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/ ml. Un analizador HITACHI 717 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) se programó para dispensar 3 μl de muestra y 150 μl de reactivo de anticuerpo en una cubeta a 37°C, que luego se mezclaron e incubaron durante 5 minutos, tras lo que se añadieron 150 μl de reactivo con enzima y se mezcló. La diferencia en la absorbancia a 340 nm se calculó a partir de la adición inicial de reactivo de enzima hasta los 4 minutos 42 segundos tras la adición del reactivo con la enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4. Este ejemplo ilustra la utilización de diferentes longitudes de enlazantes en el conjugado ligando-inhibidor.

Ejemplo 27. Preparación del primer reactivo para el ensayo de teofilina

Se preparó un litro del primer reactivo como sigue. Se dispensaron aproximadamente 800 ml de agua desionizada en un recipiente, se añadieron 6,0 gramos de ACES y se disolvieron. El pH se ajustó a 6,0 con NaOH 2 N. Luego se añadieron 0,66 gramos de NAD y se disolvieron completamente. Entonces se añadieron 0,95 gramos de azida sódica y se disolvieron, y finalmente se añadió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A y se disolvieron. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada.

Tabla 11: Composición del primer reactivo

Primer reactivo, pH 6,0 Componente	Peso molecular	M	g/ l	Función	M final en 150 μl
ACES	182,2	0,0330	6,0	Tampón, estabilizante de NAD	0,0163
NAD	663,4	0,001	0,66	Sustrato de la enzima	0,0005
Azida sódica	65,0	0,0146	0,95	Conservante antimicrobiano	0,0072
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004

Ejemplo 28. Preparación de un segundo reactivo para el ensayo de la teofilina

Se preparó un litro de un segundo reactivo como sigue. Se dispensaron aproximadamente 800 ml de agua desionizada en un recipiente y se añadieron 168,8 gramos de TAPSO Na y se disolvieron completamente. A continuación, se disolvieron 1,15 gramos de TCEP. A continuación se disolvieron 31,4 gramos de IMP, luego se disolvieron 2,23 gramos de EDTA disódico. A continuación se disolvió 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajustó a un litro con agua desionizada. Se añadió una cantidad suficiente de IMPDH-II humana recombinante (como un precipitado con sulfato de amonio al 35% de un sobrenadante de lisado de E. coli) y se disolvió completamente para conseguir un cambio en la absorbancia a 340 nm de 3100 x 10^{-4} a lo largo de 5 minutos a 37°C. A continuación se añadieron 0,00027 gramos de inhibidor ligando 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)isoprenil]-MPA (20) y se disolvieron. Finalmente, se añadieron 10 o 25 miligramos de anticuerpo monoclonal anti-teofilina.

Tabla 12: Composición de un segundo reactivo

Segundo reactivo, pH 8,0 Componente	Peso molecular	M	g/ l	Función	M final en 150 μl
TAPSO Na	281,3	0,6	168,8	Tampón, estabilizante de la enzima – reduce la agregación de la enzima	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	Estabilizante de la enzima – reduce los grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,002
IMP disódico	392,2	0,08	31,4	Sustrato de la enzima, estabilizante de la enzima	31,4
EDTA disódico	372,2	0,006	2,23	Estabilizante de la enzima – quelante de metales pesados, mantiene los grupos sulfhidrilo de la cisteína reducidos	0,003
SUTTOCIDE A (50%)	127,1	0,004	1,0	Conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	Enzima	-
Anti-Teofilina	150,000	-	0,010 – 0,025	Anticuerpo monoclonal	-
5'-[(teofilina-8-butira-midoetilaminocarbonil-oxi)isoprenil]-MPA	738,78	3,6 x 10^{-7}	2,7x10^{-4}	Inhibidor ligando	1,8 x 10^{-7}

El anticuerpo utilizado se preparó de acuerdo con los procedimientos fácilmente disponibles y conocidos para los expertos en la materia a la que la presente invención pertenece. Cualquier anticuerpo con especificidad para la teofilina, ya sea monoclonal o policlonal, puede utilizarse en la práctica de la presente invención. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales generalmente son preferibles, a causa de la facilidad y consistencia de su producción.

Ejemplo 29. Medida of teofilina

Las muestras de salina a las que se había añadido teofilina se analizaron utilizando el método de la presente invención. La teofilina (Sigma chemical) se disolvió en primer lugar en salina (1 mg/ 10 ml) y luego se diluyó para alcanzar concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 50 mg/ ml. Un analizador HITACHI 717 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) se programó para dispensar 3 μl de muestra y 150 μl de primer reactivo en una cubeta a 37°C, que luego se mezclaron e incubaron durante 5 minutos, tras lo que se añadieron 150 μl de segundo reactivo y se mezcló. La diferencia en la absorbancia a 340 nm se calculó a partir del inicio de la adición del segundo reactivo hasta los 5 minutos tras la adición del segundo reactivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.

En este ejemplo, inhibidor y anticuerpo se combinaron juntos en el mismo reactivo. El anticuerpo de teofilina particular utilizado en este ejemplo tenía una afinidad relativamente baja por el inhibidor comparado con la del fármaco, de forma que el anticuerpo y el inhibidor se combinaron en primer lugar, antes de añadir la muestra para que se preforme el conjugado inhibidor-anticuerpo. Luego, cuando se añadió la muestra que contiene el fármaco, el fármaco desplaza al inhibidor, a causa de la mayor afinidad del anticuerpo por el fármaco, liberando así al inhibidor para que pueda inhibir la enzima.

Ejemplo 30. Constantes de inhibición de los ligandos inhibidores

La CI_{50}, la constante del inhibidor, es la concentración molar de inhibidor que produce una inhibición del 50% de la actividad enzimática. Este ejemplo se utiliza para ilustrar la potencia de inhibición de la enzima por varios derivados del MPA.

Este ensayo mide la formación de NADH durante la conversión de IMP a XMP por la IMPDH-II. La reacción se monitoriza utilizando un espectrofotómetro a 340 nm durante 10 minutos a 40°C. El procedimiento utilizado en este ejemplo es el descrito por Nelson, P.H. et al., J. Med. Chem. 39, 4181-4196 (1996). Los inhibidores se diluyeron en DMSO al 100%.

Se preparó un tampón de reacción, 100 ml, que contenía Tris HCl 125 mM, pH 8,0, KCl 125 mM, EDTA 3,75 mM, BSA 125 g/ ml, IMP 0,0625 mM y NAD 0,125 mM. Se preparó un diluyente de la enzima, 100 ml, que contenía Tris HCl 100 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 3,0 mM y BSA 100 /ml.

La enzima IMPDH-II se diluyó hasta 0,0065 U/ ml en el diluyente de la enzima. La concentración final de la enzima en la cubeta de reacción fue de 0,00065 U/ ml. Las muestras (derivados) se disolvieron en DMSO hasta 1 mg/ ml. Las muestras se diluyeron con posterioridad en DMSO 100%. Todas las diluciones se prepararon frescas a partir de soluciones de reserva 1 mM preparadas previamente.

El formato de ensayo fue como sigue: se añadieron 800 μl de tampón de reacción a 6 cubetas en un espectrofotómetro. Se añadieron 100 μl de DMSO sólo (control) o de concentraciones de muestra para cada conjugado/ derivado de MPA analizado. Las cubetas con tampón de reacción y muestra se mezclaron por inversión. Las cubetas con tampón de reacción y muestra se dejaron incubar durante 5 minutos a 40°C. La reacción se inició con la adición de 100 μl de solución de enzima. Las cubetas se mezclaron de nuevo por inversión. Las reacciones se monitorizaron a 340 nm y se registraron los datos durante 10 minutos. Los resultados se utilizaron para determinar las CI_{50} de las muestras.

Se preparó MPA-isoprenilalcohol (racémico, 3A), mediante la hidrólisis con hidróxido de litio del grupo éster y la desprotección del grupo TBDPS del compuesto (3) siguiendo los métodos conocidos por los expertos en la materia y como se describe en el Ejemplo 5A. El MPA-isoprenilalcohol (3B) quiral, isómero R, se obtuvo mediante alquilación del análogo [(S)-4-bencil-2-oxazolidinon-1-il]imida [Rohloff et al., Tetrahedron Lett., 36, 7803-7806 (1995)] de (2), en la posición 5', con el bromuro de alquilo (1) de una manera similar a la descrita para la síntesis de (3); seguido de la desprotección del grupo TBDPS y la hidrólisis del grupo oxazolidinilo utilizando métodos conocidos para los expertos en la materia y como se describe en el Ejemplo 5B.

Tabla 13 Constantes de los inhibidores

Derivados de MPA	CI_{50}
MPA	$2,6 \times 10^{-8}$ M
MPA-MPA	$3,2 \times 10^{-8}$ M
MPA-isoprenilalcohol (quiral, enantiómero R, 3B)	$1,3 \times 10^{-8}$ M
MPA-isoprenilalcohol (racémico, 3A)	$4,8 \times 10^{-8}$ M
5'-(digoxigenin-3-il-ß-amidometil)-MPA (isómero B, quiral, posiblemente enantiómero R, 16B)	$6,8 \times 10^{-8}$ M
5'-(digoxigenin-3-il-ß-amidometil)-MPA (isómero A, quiral, possibly S enantiómero, 16A)	$1,7 \times 10^{-7}$ M
5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (racémico, 26)	$1,7 \times 10^{-7}$ M
5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenamido)-tiroxina]-MPA (11)	$8,3 \times 10^{-8}$ M*
5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarbonil-oxi)isoprenil]-MPA (20)	$2,5 \times 10^{-7}$ M*
conjugado 5'-[(fenitoin-3-butiramido)isoprenil]-MPA (Y)	$8,8 \times 10^{-8}$ M
conjugado 5'-[(gentamicin[C1a]-N^1-carboniloxi)-isoprenil]-MPA (R)	$6,6 \times 10^{-7}$ M
conjugado 5'-[(gentamicin[Cla]-N^1-tereftaloil)-amino-isoprenil]-MPA (unión amida, U)	$2,7 \times 10^{-7}$ M

Esta tabla muestra los datos de CI_{50} obtenidos para varios derivados de MPA. Los datos de CI_{50} son la concentración molar de inhibidor MPA que reduce la actividad de la enzima en un 50%. Los valores de CI_{50} se determinan utilizando un ajuste de la curva no lineal del gráfico de la actividad fraccional (tasa enzimática con inhibidor MPA / tasa enzimática sin ningún inhibidor MPA) en el eje y frente a la concentración molar del inhibidor MPA en la mezcla de ensayo en el eje x. Se utilizó el software Sigma-Plot 4,0 para el ajuste de la curva no lineal utilizando la fórmula de regresión; progresión hiperbólica, 2 parámetros, y = ab/ (b+x), donde y = actividad fraccional, x = concentración molar de inhibidor, a = 1, y b = CI_{50}.

Los resultados de CI_{50} muestran la importancia de la quiralidad en la posición 5' de los inhibidores de la IMPDH derivados del MPA, y la geometría espacial de nuestros enantiómeros más potentes son consistentes con Smith, D.B. et.al., Journal of Organic Chemistry 61, 2236-2241 (1996).

El derivado MPA-MPA se utilizó como inhibidor prototipo que posee un fármaco (MPA) unido a la estructura parental MPA. Como se había demostrado que el MPA-MPA funcionaba como un fármaco inhibidor prototipo en un inmunoensayo para MPA, una medida del valor CI_{50} para este inhibidor puede ser un predictor de éxito en un inmunoensayo no sólo de MPA sino también de nuevos fármacos. Estos fármacos inhibidores con valores de CI_{50} inferior serían inhibidores más potentes de la actividad de la IMPDH, y por lo tanto, serían útiles en el inmunoensayo descrito. Por ejemplo, el MPA-tiroxina isoprenilo posee un valor de CI_{50} inferior y muestra una mayor sensibilidad en un inmunoensayo que el MPA-teofilina. Además, los derivados quirales son inhibidores más potentes de la IMPDH, de forma consistente con una publicación previa que describe que el enantiómero S de un derivado del MPA es más potente. J. Org. Chem. 61, 2236-2241, (1996).

*Los valores de CI_{50} de estos derivados se determinaron utilizando un método ligeramente diferente. Para estos derivados, se determinó la tasa enzimática con y sin inhibidor como se describe en el Ejemplo 20 para la tiroxina y en el Ejemplo 29 para la teofilina, con la excepción de que no se añadió anticuerpo al segundo reactivo y se utilizó sólo salina como muestra. Se analizaron múltiples segundos reactivos, cada uno de los cuales contenía una concentración diferente de inhibidor, utilizando un HITACHI 917. El primer reactivo fue como se ha descrito en los Ejemplos 20 y 29 sin modificación. La tasa fraccional obtenida con estas concentraciones diferentes de inhibidor se representaron frente a la concentración molar de inhibidor y la CI_{50} calculada como se describe.

Ejemplo 31. Síntesis de (digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO (24)

Se disolvieron 1,35 g (9,2 mmol) de diamino-dioxa-octano en 1,3 ml de trietilamina y 15 ml de dioxano, y se agitaron a temperatura ambiente. A esta mezcla se añadió una solución de 500 mg (0,92 mmol) de digoxigenin-3-cme-NHS en 10 ml de dioxano mediante un embudo de goteo a lo largo de 15 min. Tras una hora de agitación a temperatura ambiente el solvente se evaporó y el producto bruto se disolvió en 10 ml de metanol y se purificó mediante RP-HPLC preparativo (Waters Delta Pak C-18 50 x 250 mm, agua/ acetonitrilo/ TFA 0,1%). Las fracciones puras se agruparon y se liofilizaron para proporcionar 520 mg de producto oleoso.

Ejemplo 32. Síntesis de [(dioxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (28)

A una solución de 41 mg (0,1084 mmol) de dicarboxi-MPA (27, Ejemplo 43) en 820 µl de THF se añadieron 8,77 ml (0,1084 mmol) de piridina y 15,3 ml de anhídrido trifluoroacético, y la mezcla se agitó durante 3 horas. Se añadieron 69,3 mg (0,1084 mmol) de (digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO disueltos en 820 µl de piridina y la mezcla se agitó 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con 1 ml de ácido acético y se purificó utilizando un RP-HPLC preparativo (Waters Delta Pak C-18 50 x 250 mm, agua/ acetonitrilo/ TFA 0,1%). Las fracciones que contenían producto se agruparon y se liofilizaron para proporcionar 66 mg. El producto se caracterizó

mediante ^{1}H-NMR y MS.

Ejemplo 33. Preparación de conjugado del éster metílico de 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)-isoprenil]-MPA[OMEM] (18)

Se preparó teofilina amina (17) de acuerdo con el procedimiento publicado en la solicitud de patente PCT WO 87/ 07955 (1987).

A 23 mg (0,045 mmol) del éster metílico de 5'-isoprenil[OH]-MPA[OMEM] (5) se añadieron 1,5 ml de THF seguido de 20 mg (0,078 mmol) de N,N'-disuccinimidilcarbonato y 20 μl de trietilamina. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas para proporcionar el correspondiente N-hidroxisuccinimidilcarbonato.

Se disolvieron 14 mg (0,045 mmol) de teofilina amina (17) en 1 ml de DMF anhidro y se añadieron 100 μl de trietilamina. A esta solución se añadió gota a gota la solución preparada previamente de MPA-N-hidroxi-succinimidilcarbonato (generada in situ). La mezcla de reacción se dejó en agitación bajo argón durante 3 horas y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante RP-HPLC preparativo (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) utilizando un sistema de gradiente de agua/ acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones que contenían producto se combinaron, el acetonitrilo se evaporó y la mezcla restante se liofilizó para proporcionar 10 mg (0,011 mmol, 26%) de (18). ^{1}H-NMR compatible, LC/ MS: M+H 841,3

Ejemplo 34. Preparación de conjugado de 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)-isoprenil]-MPA-[OMEM] (19)

A una solución de 11,7 mg (0,014 mmol) de conjugado de éster metílico de 5'-[(teofilina-8-butiramido-etilaminocarboniloxi)isoprenil]-MPA-[OMEM] (18) en 2,4 ml de metanol en agitación bajo argón se añadió una solución de 24 mg (0,572 mmol) de hidróxido de litio monohidrato en 1,2 ml de agua. La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón, monitorizando mediante RP-HPLC (Vydac C-18; 300 Å 218TP54; 4,6 mm x 250 mm; gradiente de TFA 0,1% - H_2O/ TFA 0,1% - CH_3CN). Tras 4 días a temperatura ambiente, el consumo del material de partida era casi completo, con una aparición creciente de un pico con un tiempo de retención menor. La mezcla de reacción se acidificó con ácido fosfórico diluido (precipitado), se concentró hasta la sequedad, se trituró con metanol y los sólidos se separaron por filtración. El filtrado se concentró hasta la sequedad, el residuo se disolvió en CH_3CN-H_2O (1:1) y se purificó mediante RP-HPLC preparativo (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) utilizando un gradiente de TFA 0,1% - H_2O/ TFA 0,1% - CH_3CN. Las fracciones que contenían producto se combinaron, se eliminó el acetonitrilo por evaporación bajo presión reducida y el residuo se liofilizó para proporcionar 8 mg (0,0097 mmol, 69%) de (19) como un sólido blanco.

Ejemplo 35 Preparación de 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)-isoprenil]-MPA (20)

A una solución de 1,0 mg (0,0012 mmol) de conjugado de 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)-isoprenil]-MPA-[OMEM] (19) en 200 ml de cloruro de metileno seco bajo argón y enfriada en un baño con hielo, se añadió una solución fría de 20 ml de ácido trifluoroacético disuelto en 40 ml de cloruro de metileno en 3 porciones a lo largo de aproximadamente un minuto. Tras agitar durante 20 minutos manteniendo el frio, el material volátil se evaporó mediante aspiración directa bajo un elevado vacío. El RP-HPLC (Vydac C-18; 300 Å 218TP54; 4,6 mm x 250 mm; gradiente TFA 0,1% - H_2O/ TFA 0,1% - CH_3CN) y ^{1}H-RMN (CD_3OD) del residuo indicó una formación parcial del producto deseado desprotegido de MEM. El material se reagrupó, se concentró hasta la sequedad, se re-disolvió en cloruro de metileno seco y se re-evaporó (3X). El residuo se sometió de nuevo al tratamiento con TFA como se ha descrito anteriormente pero en agitación durante 35 minutos. Los solventes se eliminaron como anteriormente. El análisis de RP-HPLC y ^{1}H-NMR del residuo indicó una nueva formación del producto deseado y la reducción de los materiales de partida. El material reagrupado se reconcentró, se trató como anteriormente y se sometió de nuevo a un tratamiento con TFA como se ha descrito anteriormente por tercera vez, en agitación durante 30 minutos. El análisis de RP-HPLC de la mezcla de reacción resultante indicó que esencialmente había finalizado la reacción, con un aumento de los picos de los subproductos. La reacción se concentró hasta la sequedad, se re-disolvió en CH_3CN y se purificó mediante RP-HPLC semi-preparativo (Vydac C-18; 300 Å 218TP510; gradiente de TFA 0,1% -H_2O/ TFA 0,1% - CH_3CN). Las fracciones que contenían producto se agruparon, se eliminó el CH_3CN por evaporación bajo una presión reducida y el residuo se liofilizó para proporcionar alrededor de 0,5 mg (~0,00068 mmol, ~56%) de (20) como un sólido blanco. ^{1}H-NMR compatible, LC/ MS: M+H 739,3, M+Na 761,3

Ejemplo 36. Preparación de éster metílico de 5'-t-butoxicarbonilmetil-MPA (21)

Una solución de 26 ml (26 mmol) de bis(trimetilsilil)amida sódica (solución 1,0 M en THF) se enfrió en un baño de hielo seco/ acetona hasta -78°C bajo una atmósfera de argón. A esta solución fría se añadieron 2,6 ml (22 mmol) de DMPU y se dejó en agitación a -78°C durante 15 minutos. Una solución de 2,86 g (8,56 mmol) de éster metílico de MPA (2) en 45 ml de THF recién destilado se añadió gota a gota a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se dejó en agitación a -78°C durante 1 hora y el color de la mezcla de reacción cambió de amarillo pálido a amarillo anaranjado. A la mezcla de reacción se añadieron 1,9 ml (912,8 mmol) de bromoacetato de t-butilo y la mezcla de reacción se dejó en agitación a -78°C durante 3 horas. La reacción se detuvo con 20 ml de una solución saturada de

cloruro amónico y la mezcla se dejó alcanzar la temperatura ambiente. Se añadieron 200 ml adicionales de cloruro amónico saturado y la mezcla de reacción se extrajo con 3 x 200 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 300 ml de cloruro amónico saturado, se secaron y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice utilizando hexano al 30% en acetato de etilo para proporcionar 3,87 g de un semisólido. Una porción de este producto (1,45 g) se purificó mediante RP-HPLC (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) utilizando con varias repeticiones un sistema de gradiente de acetonitrilo/ agua que contenía un 0,1% de ácido trifluoroacético. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se evaporó el acetonitrilo. El residuo se liofilizó para proporcionar 669 mg (1,49 mmol, 47%) del éster metílico de 5'-t-butoxicarbonilmetil-MPA (21).

Ejemplo 37. Preparación de éster metílico de 5'-carboximetil-MPA (22)

A 300 mg (0,67 mmol) de éster metílico de 5'-t-butoxicarbonilmetil-MPA (21) se añadieron 15 ml de una solución de ácido trifluoroacético al 50% en diclorometano. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando metanol al 20% en acetato de etilo para proporcionar 250 mg (0,63 mmol, 95%) del éster metílico de 5'-carboximetil-MPA (22). ^{1}H-NMR compatible, HR-FAB MS: calculado para M+Na 415,1369, observado 415,1352.

Ejemplo 38. Escisión del éster de t-butilo (método alternativo)

A una solución de 360 mg (0,8 mmol) de (21) en 3,6 ml de diclorometano se añadieron 3,6 ml de TFA y la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos. Se añadieron 200 ml de tampón fosfato potásico 0,5 M pH 7,0 y la mezcla se extrajo tres veces con 100 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se agruparon, se secaron sobre sulfato magnésico y el solvente se evaporó. El producto se caracterizó mediante HPLC y ^{1}H-NMR.

Ejemplo 39. Preparación del éster metílico de 5'-(succinimido-N-oxi)carbonilmetil-MPA (23)

A 200 mg de éster metílico de 5'-carboximetil-MPA (22) bruto, 244 mg (2,12 mmol) de N-hidroxisuccinimida y 437 mg (2,12 mmol) de diciclohexilcarbodiímida disueltos en 2 ml de THF se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La diciclohexilurea que precipitó se eliminó mediante filtración y el filtrado se purificó utilizando un RP-HPLC preparativo (Waters Delta Pak C-18 50 x 250 mm, agua/ acetonitrilo/ TFA 0,1%).

Las fracciones que contenían producto se agruparon y se liofilizaron inmediatamente para proporcionar 129 mg de (23). El producto se caracterizó mediante ^{1}H-NMR y MS. ^{1}H-NMR compatible, HR-FAB MS: calculado para M+H 490,1713, observado 490,1702.

Ejemplo 40. Preparación de éster metílico de 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (25)

A una solución de 166 mg (0,259 mmol, digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO en 3,48 ml de DMF anhidro y 179 ml de trietilamina, se pipetearon 127 mg (0,259 mmol) de (23) en 1,74 ml de DMF anhidro. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. Luego se añadieron 500 ml de ácido acético a la solución y la mezcla se purificó utilizando un RP-HPLC preparativo (Waters Delta Pak C-18 50 x 250 mm, agua/ acetonitrilo/ TFA 0,1%). Las fracciones que contenían producto se agruparon y se liofilizaron para proporcionar 240 mg de (25). El producto se caracterizó mediante ^{1}H-NMR y MS.

Ejemplo 41. Preparación de 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (26)

200 mg (0,2098 mmol) de éster metílico de 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (25) disueltos en 28,7 ml de DMSO se mezclaron lentamente con 56 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,0. La mezcla pasó a ser ligeramente turbia. Se añadieron 219 μl de esterasa (Roche Diagnostics, Nº Cat. 104698) y la mezcla se agitó durante 13 días. El precipitado se filtró y el filtrado se purificó utilizando un RP-HPLC preparativo (Waters Delta Pak C18 50 x 250 mm, agua/ acetonitrilo/ TFA 0,1%). Las fracciones que contenían producto se agruparon y se liofilizaron para proporcionar 68 mg de (26). El producto se caracterizó mediante ^{1}H-NMR y MS.

Ejemplo 42. Síntesis de MPA-MPA

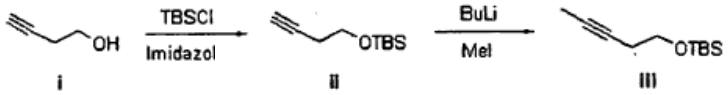
Una solución de éster metílico del ácido micofenólico (2, 1,337 g, 4 mmol) en 6 ml de tetrahidrofurano bajo una atmósfera inerte se enfrió hasta -78°C y se trató con hexametildisilazida sódica (9 ml, 1 M en tetrahidrofurano, 9 mmol) a lo largo de 25 minutos. Tras 15 minutos de agitación, se añadió bromuro de (E)-4-1,3-dihidro-6-metoxi-4-metoxietoximetoxi-7-metil-3-oxoisobenzofuran-5-il)-2-metilbut-2-enilo preparado como en la patente US 5,493,030, ejemplo ZA-12B (1,36 g, 3,17 mmol) como una solución en tetrahidrofurano (4 ml) a lo largo de 15 minutos. La reacción se dejó calentar lentamente hasta alrededor de -40°C a lo largo de 1,5 horas, luego la reacción se bloqueó vertiéndola en una mezcla de hielo, agua y ácido clorhídrico concentrado (2 ml). La extracción del producto en acetato de etilo (2 x 100 ml) fue seguida por un secado sobre sulfato magnésico. Los orgánicos se filtraron y el solvente se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. La cromatografía utilizando un 40% de acetato de etilo en hexanos, luego un 60% de acetato de etilo en hexanos, y finalmente un 80% de acetato de etilo en hexanos dio

lugar al producto de alquilación como un aceite (191 mg) que se utilizó en la siguiente reacción.

El producto de alquilación (190 mg) se disolvió en metanol (30 ml) y se trató con 660 mg de ácido p-toluenosulfónico y se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 5 horas. El metanol se eliminó entonces bajo presión reducida y la reacción se particionó entre agua y acetato de etilo. La fase acuosa se lavó con 75 ml de acetato de etilo, y luego las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato magnésico. La filtración fue seguida por la eliminación del solvente para conseguir 150 mg de material, que se utilizó en el último paso.

El éster anterior se disolvió en metanol:agua 1:1 y se añadieron 400 mg de hidróxido de litio. La reacción se agitó con agitación magnética bajo nitrógeno durante 20 horas a 60°C, luego se enfrió y se vertió sobre $NaHSO_4$ 1 M y se extrajo tres veces con acetato de etilo (50 ml x 3). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera saturada, luego se secaron sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó bajo presión reducida, y luego se obtuvo el producto bruto (101 mg) tras la re-cristalización a partir de éter de t-butilmetilo/ hexanos. Una cromatografía rápida de este material utilizando hexanos:acetato de etilo 1:1 con ácido acético al 1% seguido de otra re-cristalización utilizando acetato de etilo dio lugar al producto final (80 mg, p. f. 146,4 - 147,4°C).

Ejemplo 43 Preparación de 4'-carboximetil-MPA (27)



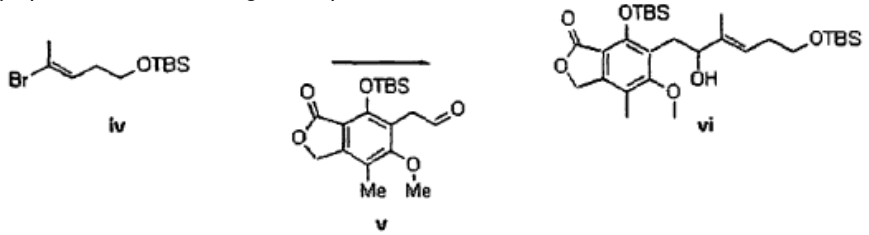
i ii iii

Una solución de 3-butin-1-ol (i, 10,0 g, 143 mmol, Aldrich Chemical Company) se agitó a temperatura ambiente en 200 ml de diclorometano. Se añadió imidazol (12,6 g, 186 mmol), seguido de cloruro de terc-butildimetilsililo (22,6g, 150 mmol, TBSC1) y la solución se agitó durante 20 minutos. La reacción se diluyó con cloruro de metileno y se lavó con agua, solución de HCl acuosa 1 N, salmuera y se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó al vacío, el residuo se diluyó con hexanos, se filtró y el solvente se eliminó al vacío para proporcionar el éter de sililo (ii) como un aceite, 23,1 g, que se utilizó sin posterior purificación.

Una solución del éter de sililo (ii) preparado anteriormente (8,8 g, 48 mmol) en 200 ml de tetrahidrofurano se enfrió bajo una atmósfera inerte hasta -78°C y se añadió una solución de n-BuLi (31,5 ml, 50,5 ml, 1,6 M en hexanos) a lo largo de 15 minutos mediante una jeringa. La solución se agitó a -78°C durante 1,5 horas, en cuyo momento se añadió yodometano (67,7 g, 480 mmol) puro y la solución se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadieron 20 ml de una solución acuosa de cloruro de amonio 1 N, se eliminó el tetrahidrofurano al vacío, y la fase acuosa se extrajo dos veces con dietiléter. La solución de éter se lavó dos veces con agua, luego salmuera, y se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó al vacío para proporcionar 8,5 g de (iii) como un aceite, que se utilizó sin posterior purificación.

iii iv

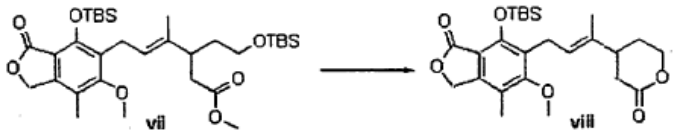
Una suspensión de dicloruro de bis(ciclopentildienil)zirconio (16,0 g, 55 mmol) se agitó en 100 ml de THF a temperatura ambiente bajo una atmósfera inerte. Se añadió una solución de trietilborohidruro de litio (55 mmol, 55 ml, 1M en tetrahidrofurano) y la solución se agitó durante 1 hora. Se añadió una solución del éter de sililo (iii) preparado anteriormente (5,0 g, 27 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano mediante una cánula. entonces se calentó la reacción hasta 50°C durante 1,5 horas y luego se enfrió hasta 25°C. Entonces se añadió N-bromosuccinimida (9,8 g, 55 mmol), la reacción se agitó durante 20 min. y luego se bloqueó con 50 ml de tiosulfato sódico 1 N. La mezcla se diluyó con éter de dietilo, se filtró a través de celite, y se lavó sucesivamente con tiosulfato sódico 1 N y salmuera, luego se secó sobre sulfato magnésico. El residuo obtenido tras eliminar los solventes al vacío se sometió a cromatografía en gel de sílice utilizando hexanos como eluyente para proporcionar el producto bromuro de vinilo (iv) como un aceite (2,1 g), que se utilizó en el siguiente paso.



iv v vi

Una suspensión de magnesio (350 mg, 14 mmol) se agitó en una mezcla de 20 ml de éter de dietilo y 5 ml de benceno bajo una atmósfera inerte a temperatura ambiente. A la mezcla se añadió dibromuro de etileno (2,7 g, 14,4 mmol, 1,24 ml) a lo largo de 30 minutos mediante una jeringa, manteniendo la reacción a reflujo suave. En un recipiente separado se agitó una solución del bromuro de vinilo (iv, 3,65 g, 13 mmol) en 100 ml de THF a -78°C. A esta solución se le añadió terc-butil-litio (27,4 mmol, 16,1 ml de una solución 1,7 M en hexanos) gota a gota a lo largo de 15 minutos. A la solución resultante de vinil-litio se le añadió la solución de bromuro de magnesio anterior mediante una cánula a lo largo de 10 minutos, y la solución se agitó a -78°C durante 30 minutos para formar una solución de Grignard vinílica. Se añadió una solución del aldehído (v) [Smith et al., J. Org. Chem. 61, 2236-2241 (1996)] (5,0 g, 14,4 mmol) en 10 ml de THF a la solución de Grignard vinílica mediante una cánula a lo largo de 5 minutos. La reacción se dejó calentar hasta 0°C y se agitó durante 25 minutos. Entonces la reacción se detuvo con 30 ml de una solución acuosa de cloruro de amonio 1 N, se extrajo con éter de dietilo 3 veces, y la solución etérea se lavó con una solución acuosa de cloruro de amonio 1 N y salmuera, y se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de acetato de etilo en hexanos del 10% al 20% para proporcionar 2,90 g del producto alcohol alílico (vi) como un aceite.

Una mezcla del alcohol alílico (vi, 2,6 g, 4,7 mmol) se calentó en una mezcla de trimetilortoacetato (11,4 g, 12,0 ml, 95 mmol) y ácido piválico (48 mg, 0,5 mmol) a reflujo durante 11 horas. La reacción se enfrió y se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se diluyó entonces con éter dietílico, se lavó con agua, solución acuosa saturada de bicarbonato y salmuera, y se secó sobre sulfato magnésico. Los solventes se eliminaron al vacío y el residuo se sometió a una cromatografía en gel de sílice utilizando un 15% de acetato de etilo en hexanos como eluyente para proporcionar 1,5 g del éster metílico del producto (vii) como un aceite.



Una solución del éster metílico (vii, 1,5 g, 2,5 mmol) en 50 ml de acetonitrilo se agitó a temperatura ambiente. Se añadió una solución de 5 ml de una solución HF al 40% diluido en 50 ml de acetonitrilo y la reacción se agitó durante 5 minutos. El solvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en éter dietílico, se lavó 3 veces con bicarbonato acuoso saturado, luego con salmuera, y se secó sobre sulfato magnésico. Los solventes se eliminaron para proporcionar 1,0 g de la lactona (viii) como un aceite que se utilizó sin posterior purificación.

Una solución de la lactona (viii, 1,0 g, 2,0 mmol) se disolvió en 10 ml de acetona y se enfrió hasta 0°C. Se añadió a la solución reactivo de Jones (1,2 ml, 3,6 mmol, de una solución acuosa 3M) y la reacción se agitó durante 45 minutos. La reacción se detuvo con 3 ml de metanol, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 N, dos veces con agua, salmuera, y se secó sobre sulfato magnésico. Los solventes se eliminaron al vacío y el residuo se sometió a una cromatografía en gel de sílice utilizando un 35% de acetato de etilo y un 1% de ácido acético en hexanos como eluyente, para proporcionar 463 mg del diácido protegido (ix) como un aceite.

El diácido protegido (ix, 401 mg, 0,8 mmol) se agitó en 10 ml de metanol a temperatura ambiente. Se disolvió hidróxido de litio hidrato en una solución de 10 ml de metanol y 2 ml agua, y se añadió a la solución de diácido, y la

reacción se agitó durante 3,5 horas. La reacción se detuvo con 10 ml de ácido clorhídrico acuoso 1 N, se extrajo con acetato de etilo 3 veces, las capas de acetato de etilo se combinaron y se lavaron con salmuera. Los solventes se eliminaron y el sólido así obtenido se trituró con una mezcla de éter de dietilo y hexanos. El sólido resultante se re-cristalizó a partir de cloruro de metileno/ hexanos para proporcionar 201 mg de 4'-carboximetil MPA (27), p.f. = 178°C.

Ejemplo 44. Preparación de éster metílico de 5'-isoprenil[ftalimida]-MPA(OMEM) (A)

A 144 mg (0,28 mmol) de éster metílico de 5'-isoprenil[OH]-MPA[OMEM] (5) se añadieron 10 mL de THF recién destilado seguido de 96 mg (0,36 mmol) de trifenilfosfina, 53 mg (0,36 mmol) de ftalimida y 72 mL (0,36 mmol) de diisopropilazodicarboxilato. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas y el progreso de la reacción se monitorizó mediante una cromatografía en capa fina (TLC) utilizando un 50% de acetato de etilo en hexano. El análisis de TLC indicó la formación del producto deseado y la presencia de una cantidad significativa del alcohol MPA de partida (5) en la mezcla de reacción. A la mezcla de reacción se añadieron 96 mg (0,36 mmol) adicionales de trifenilfosfina, 53 mg (0,36 mmol) de ftalimida, 72 mL (0,36 mmol) de diisopropilazodicarboxilato y 1 g de tamices moleculares de 4Å. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 100 mL de acetato de etilo y se lavó con 2 x 50 mL de agua. La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se purificó mediante una cromatografía rápida en columna de gel de sílice utilizando un 50% de acetato de etilo en hexano para proporcionar 151 mg (0,24 mmol, 84%) de (A) como una goma espesa, incolora. ^{1}H-NMR: compatible. HR-ES (+) MS: calculado M+Na 658,2622, observado 658,2617.

Ejemplo 45. Preparación de éster metílico de MPA[OMEM]-5'-isoprenilamina (B)

A 165 mg (0,25mmol) de (A), del Ejemplo 44, se añadieron 4 mL de metilamina 2 M en metanol. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas y luego se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando un 80% de cloroformo en metanol como eluyente para proporcionar 70 mg (0,14 mmol, 53%) de (B) como una goma espesa, incolora. ^{1}H-NMR: compatible. HR-ES (+) MS: calculado M+H 506,2749, observado 506,2750.

Ejemplo 46. Desprotección del éster metílico de MPA[OMEM]-5'-isoprenilamina (B) a MPA-5'-isoprenilamina (D)

A una solución de éster metílico de MPA[OMEM]-5'-isoprenilamina (B, 24 mg) en metanol (MeOH, 1 mL) se añadió una solución de hidróxido de litio (LiOH) monohidrato (25 mg) en 1 mL de agua desionizada y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 3 días. La reacción se siguió de una RP-LC/ MS analítica, que mostró la desaparición gradual del material de partida y la aparición de la correspondiente MPA[OMEM]-5'-isoprenilamina (C), junto con una sustancia de rápida eliminación (ion molecular = C+18) que se asigna como la sustancia con la lactona abierta (Ca). Entonces se acidificó la mezcla con HCl 1 N hasta un pH de alrededor de 0-1 y se agitó a temperatura ambiente. La LC/ MS analítica mostró la desaparición del pico asignado como (Ca), presumiblemente debido al cierre de nuevo del anillo lactona, con una desprotección gradual del grupo metoxietoximetilo (MEM) para proporcionar el material deseado totalmente desprotegido (D). La desprotección se completó mediante la concentración de la mezcla bajo presión reducida (rotavapor) para eliminar el metanol, seguido de un posterior concentración bajo un vacío elevado (rotavapor con un condensador de hielo seco/ acetona) para proporcionar (D) bruto como un sólido ligeramente pegajoso. El material se re-disolvió en acetonitrilo (MeCN) y agua 1:1 y se purificó mediante una RP-HPLC preparativa (gradiente del 5% creciente hasta un 100% a lo largo de 20 min. de [ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% / MeCN] en [TFA 0,1%/ agua]; tasa de flujo = 20 mL/ min.) para proporcionar, en dos fracciones tras la liofilización, (D, 10,9 mg) asignado como la sal del ácido trifluoroacético, como un sólido blanco. ^{1}H-NMR: compatible. LC/ MS: M+H 404,2.

En otro experimento, tras la hidrólisis de 25 mg de (B) con 25 mg de hidróxido de litio en 1 mL de agua + 1 mL de metanol como se ha descrito anteriormente en (i) pero con agitación durante 5 días, la reacción se neutralizó con ácido fosfórico 1 N hasta alrededor de pH 7. La LC/ MS analítica mostró la persistencia de los dos picos correspondientes a (C) y los asignados para (Ca) como se ha descrito en (i) anteriormente. La mezcla se diluyó con MeCN y un poco de agua (ambas contenían TFA al 0,1%) y se purificó mediante RP-HPLC preparativo, utilizando los mismos solventes y un gradiente como se ha descrito anteriormente. El perfil de elución indicó que ahora ya no se encontraba (Ca) o se había reducido notablemente, lo que se atribuye al cierre de nuevo de la lactona bajo estas condiciones fuertemente ácidas. Las fracciones apropiadas se aislaron y se liofilizaron para proporcionar MPA[OMEM]-5'-isoprenilamina purificada (C, 16,7 mg) como un sólido blanco, asignada como la sal del ácido trifluoroacético. ^{1}H-NMR: compatible. LC/ MS: M+H 492,2.

En otro experimento, tras el tratamiento de (B, 25 mg) con LiOH (25 mg) en MeOH-agua de forma idéntica la descrita anteriormente, la reacción se acidificó hasta alrededor de pH 2 con HCl 1 N. La evaporación hasta sequedad bajo un vacío elevado dio lugar a un residuo, que en una LC/ MS analítica mostró que contenía una mezcla de (D) totalmente desprotegido [principal] y de (C) protegido con OMEM. El residuo se disolvió en una mezcla de CH_2Cl_2 seco (800 mL) y TFA (200 mL) y se agitó durante 0,5 horas a temperatura ambiente. La evaporación, redisolución en CH_2Cl_2 seco y la re-evaporación dieron lugar a un residuo, que en una LC/ MS analítica

mostró que contenía el producto deseado (D) totalmente desprotegido [principal] junto con muchos otros y dos impurezas principales, ambas de rápida eliminación, una de las cuales poseía el mismo ion molecular en la LC/ MS que el producto deseado (D). La RP-HPLC preparativa en una porción de la mezcla dio lugar, tras el aislamiento de las fracciones apropiadas y la liofilización, a: (D, ^{1}H-NMR: compatible; LC/ MS: M+H 404,2) y la impureza de rápida eliminación que poseía una LC/ MS: M+H 404,2; y un espectro de ^{1}H-NMR indicativo de cerrado del grupo ácido en uno de los dobles enlaces isoprenilo para formar una segunda lactona.

Ejemplo 47. Preparación de conjugado digoxina-MPA, conjugado 5'-[[[[(digoxin(1,4-oxazepin))-4-il]-fenil-4-carbonil]amino]isoprenil]-MPA (H)

Se sintetizó digoxina dialdehído (E) a partir de digoxina mediante una oxidación con peryodato sódico en etanol acuoso tras el procedimiento análogo utilizado con la digitoxina, descrito por Satoh y Aoyama (D. Satoh y K. Aoyama Chem. Pharm. Bull. (Jpn), 1970, 18, 94-99).

Se disolvió ácido para-aminobenzoico (0,221 g, 1,61 mmol) en un total de 3 mL de metanol que entonces se diluyó con 3 mL de ácido acético 0,3 M en agua. La solución resultante se añadió a una solución en agitación de digoxina dialdehído (E, 1,0 g, 1,28 mmol) en metanol (20 mL) bajo argón. A la mezcla amarilla resultante se añadió una solución de cianoborohidruro sódico ($NaCNBH_3$, 0,11 g, 1,75 mmol) en un total de 4 mL de 0,3 M ácido acético en agua. Tras su agitación durante toda la noche a temperatura ambiente, una cromatografía en capa fina (TLC) indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción clara se evaporó hasta la sequedad bajo una presión reducida (a menos de 30°C). El residuo sólido blanquecino se repartió entre cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y HCl acuoso 0,1 N. Las capas se separaron, la fase orgánica se lavó secuencialmente con HCl 0,1 N (x2), agua (x1), NaCl ac. sat. (x1), se secó (Na_2SO_4), se filtró, se evaporó bajo presión reducida y se secó bajo un vacío elevado (múltiple) para dar lugar al producto bruto (1,06 g) como un sólido blanco. El material se re-disolvió en cloroformo ($CHCl_3$) - MeOH y se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice preempaquetado en MeOH al 10% en $CHCl_3$ y se eluyó con MeOH al 10% en $CHCl_3$. Las fracciones apropiadas que contenían producto se combinaron para proporcionar una fracción inicial de producto (F, 75 mg, 6,6%) que contenía trazas de una impureza de eliminación rápida; y la principal acumulación del producto [ácido (digoxin(1,4-oxazepin))-4-il]-fenil-4-carboxílico (F, 585 mg, 52%). ^{1}H-NMR: compatible. LR (+) SIMS MS: compatible. HR-FAB MS: calculado M+H 883,4718, observado 883,4702. UV (MeOH): λ 221 (ε 17,384), 307 (ε 22,621) nm. Microanálisis: calculado para $C_{48}H_{69}NO_{14}$• 5/4 $CHCl_3$: C, 57,25; H, 6,85 y N, 1,36%. Obtenido: C, 57,11; H, 6,90 y N, 1,25%.

A una solución en agitación de (F, 600 mg, 0,679 mmol) en CH_2Cl_2 seco (60 mL) bajo argón se añadió N-hidroxisuccinimida (NHS, 102 mg, 0,886 mmol) seguido de clorhidrato de 1-etil-3-dimetilaminopropil-carbodiimida (EDC• HC1, 170 mg, 0,886 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 16 horas. El análisis de TLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla reacción clara se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó secuencialmente con HCl 0,1 N (x4), agua (x1), bicarbonato sódico ac. sat. ($NaHCO_3$, x4), NaCl ac. sat. (x1), se secó (Na_2SO_4), se filtró, se evaporó bajo presión reducida y se secó bajo un vacío elevado para proporcionar el producto bruto (634 mg) como una espuma blanca. El material se re-disolvió en un volumen mínimo de acetato de etilo (EtOAc)/ hexanos aprox. 9:1 y se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (80 g) preempaquetado en EtOAc al 75% en hexanos, se eluyó en primer lugar con EtOAc al 75% en hexanos, y luego con EtOAc solo. El principal grupo de fracciones que contenían producto se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se re-disolvió en CH_2Cl_2 seco destilado y se re-evaporó hasta la sequedad, repitiendo el proceso 6-7 veces, y finalmente se secó bajo un vacío elevado (múltiple) durante toda la noche a temperatura ambiente para proporcionar el éster de NHS deseado, [(digoxin(1,4-oxazepin))-4-il]-fenil-4-carboxilato de N-hidroxisuccinimida (G, 475 mg, 71%) como un sólido blanco. ^{1}H-NMR: compatible. LR (+) SIMS MS: compatible. HR FAB MS: calculado M+Na 1003,4780, observado 1003,4767. UV (MeOH): λ 216 (ε 23,907), 324 (ε 38,186) nm. Microanálisis: calculado para $C_{52}H_{72}N_2O_{16}$ • ½ CH_2Cl_2 • 1/4 H_2O: C, 61,33; H, 7,21; N, 2,72%. Obtenido: 61,31; H, 7,21 y N, 2,63%.

Se disolvieron juntos MPA-5'-isoprenilamina totalmente desprotegida (D), en forma de sal de trifluoroacetato, (3,3 mg, 0,0064 mmol) y el éster de NHS (G, 7,0 mg, 0,0071 mmol), en CH_2Cl_2 seco (200 μL) en un vial de reacción de 1 mL de capacidad (Wheaton Reacti-Vial) con una cavidad en forma de v, y que también contienen una pequeña barra agitadora en forma de v. Se añadió trietilamina (Et_3N, 5 μL, aprox. 0,36 mmol), el vial se tapó herméticamente (tapón de rosca con una capa de teflón) y la reacción se agitó durante 2,5 días a temperatura ambiente. La LC/ MS analítica indicó que la reacción se había completado. La reacción se diluyó con un poco de CH_2Cl_2 y se purificó directamente mediante una cromatografía en capa fina (4 placas, grosor del sílice 20 x 20 cm x 0,025 cm; E.M. Science, Nº Cat. 5715-7), eluyendo con MeOH al 10% en $CHCl_3$. La banda de producto (R_f aprox. 0,27) se cortó, se molió y se lavó/ eluyó (embudo de vidrio sinterizado) con MeOH al 25% en $CHCl_3$. Los lavados recolectados se evaporaron hasta la sequedad, se recogió en un poco de MeOH al 10% en CH_2Cl_2, se filtraron (Gelman Laboratory, filtro de jeringa GHP Acrodisc 25 mm, membrana GHP 0,45 μm, Nº part. 4560T), se evaporaron hasta la sequedad, se re-disolvieron en CH_2Cl_2 seco y se re-evaporaron (repetido x2) y se secaron bajo un vacío elevado (múltiple) para proporcionar el conjugado digoxina-MPA (H, 4,2 mg, 52%) como un sólido blanco. ^{1}H-NMR: compatible. LC/ MS: M+H 1269,6, M+Na 1291,6.

Ejemplo 48. Preparación de conjugado de digitoxina-MPA, conjugado de 5'-[[[[((digitoxina(1,4-oxazepin))-4-il]-fenil-4-carbonil]amino]isoprenil]-MPA (L)

Se preparó dialdehído de digitoxina (I) a partir de digitoxina mediante oxidación con peryodato de sodio en etanol acuoso siguiendo el método de Satoh & Aoyama (D. Satoh y K. Aoyama Chem. Pharm. Bull. (Jpn), 1970, 18, 94-99).

El dialdehído de digitoxina (I, 1,0 g, 1,31 mmol) en MeOH (20 mL) se hizo reaccionar con ácido para-aminobenzoico (220 mg, 1,60 mmol; disuelto en 6 mL de 1:1 MeOH- HOAc 0,3 M en agua) y $NaCNBH_3$ (108 mg, 1,72 mmol; disuelto en 3 mL de HOAc 0,3 M en agua) de forma similar al Ejemplo 47 (ii), durante 1,5 horas. Se añadió $NaCNBH_3$ adicional (52 mg, 0,83 mmol), y tras 4,33 horas en total, el análisis por TLC indicó que la reacción se había completado. Se llevo a cabo la reacción y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice de forma similar a la descrita en el Ejemplo 47 (ii) para proporcionar, a partir de los cortes principales de las fracciones de cromatografía, ácido [(digitoxina(1,4-oxazepin))-4-il]-fenil-4-carboxílico (J, 443 mg, 39%). ^{1}H-RMN: compatible. LR (+) SIMS MS: compatible. HR FAB MS: Calculado M^+ 867,4769, Observado 867,4798. UV (MeOH): λ 220 (ε 18,094), 308 (ε 23,364) nm. Microanálisis: Calculado para $C_{48}H_{69}NO_{13}$ • $CHCl_3$ • 1/3 H_2O : C, 59,24; H, 7,17; N, 1,41%. Encontrado: C, 59,11; H, 7,09; N, 1,32%. Se obtuvo menos material puro (301 mg) de las últimas fracciones.

La reacción del ácido (J, 535 mg, 0,616 mmol) con NHS (92 mg, 0,80 mmol) y EDC•HCl (154 mg, 0,80 mmol) en CH_2Cl_2 seco (40 mL) durante toda la noche a temperatura ambiente bajo argón de forma similar al Ejemplo 47 (iii) seguido del procedimiento de síntesis y purificación mediante cromatografía en gel de sílice de forma similar a la descrita en el Ejemplo 47 (iii) proporcionó, a partir de las fracciones apropiadas tras la evaporación y el secado bajo un alto vacío el éster de NHS deseado, éster de N-hidroxisuccinimida del ácido [(digitoxina(1,4-oxazepin))-4-il]-fenil-4-carboxílico (K, 423 mg, 71%) como un sólido blanco. ^{1}H-RMN: compatible. LR (+) SIMS MS: compatible. HR FAB MS: Calculado M^+ 964,4933, Observado 964,4945. UV (MeOH): λ 216 (ε 18,639), 324 (ε 37,261) nm. Microanálisis: Calculado para $C_{52}H_{72}N_2O_{15}$ • 1/5 EtOAc •2/5 CH_2Cl_2: C, 62,85; H, 7,38; N, 2,76%. Encontrado: C, 62,97; H, 7,27; N, 2,82%.

Una suspensión de MPA-5'-isoprenilamina completamente desprotegida (D), como la sal de trifluoroacetato (3,4 mg, 0,0066 mmol), y el éster de NHS (K, 7,0 mg, 0,0073 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1 mL) que contenían Et_3N (5 mL, aprox. 0,036 mmol) se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante aproximadamente 24 horas. La LC/ MS analítica de la mezcla ligeramente nubosa indicó que ambos materiales de partida estaban aún presentes, junto con el producto deseado. Se añadió dimetilformamida seca (DMF) y la reacción se agitó durante 24 horas adicionales, tras las cuales la LC/ MS indicó que la reacción se había completado esencialmente. La reacción se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida, después bajo un vacío elevado. El residuo se re-disolvió en un poco de MeOH al 10% en $CHCl_3$ y se purificó mediante cromatografía en capa fina (4 placas, 20 x 20 cm x 0,025 cm de espesor de sílice; E.M. Science, Nº Cat. 5715-7), eluyendo con MeOH al 10% en $CHCl_3$. La banda de producto (Rf aproximado de 0,39) se recortó, se troceó, y se lavó /eluyó (embudo de vidrio sinterizado) con MeOH al 25% en $CHCl_3$. Los lavados recogidos se evaporaron hasta la sequedad, se recogieron en un poco de MeOH al 10% en CH_2Cl_2, se filtraron (Gelman Laboratory, GHP Acrodisc filtro de jeringa de 25 mm, membrana de GHP 0,45 μm, Nº de part. 4560T), se evaporaron hasta la sequedad, se re-disolvieron en CH_2Cl_2 seco y se re-evaporaron (repetición x3) y se secaron bajo un vacío elevado (múltiple) para proporcionar el conjugado de digitoxin-MPA (L, 5,2 mg, 63%) como un sólido blanco. ^{1}H-RMN: compatible. LC/ MS: M+H 1253,8, M+Na 1275,6.

Ejemplo 49. Preparación de conjugado gentamicina-MPA completamente protegido (enlace carbamato), éster metílico de conjugado 5'-[(N2',N3,N6-tri-tbutoxicarbonil-N3"-trifluoroacetil-gentamicina-[C1a]-N1-carbonil-oxi)-isoprenil]-MPA[OMEM] (N)

A 20 mg (0,039 mmol) de éster metílico de 5'-isoprenil[OH]-MPA[OMEM] (5) se añadió 1 mL de THF seguido por 10,1 mg (0,039 mmol) de carbonato de N,N'-disuccinimidilo y 25 mL de trietilamina. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas para proporcionar el correspondiente carbonato de N-hidroxisuccinimidilo.

A 550 mg (1,22 mmol) de gentamicina C1A se añadió 35 mL de DMF anhidro, seguido de 1,04 g (4,74 mmol) de acetato de zinc dihidratado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante 5 días. A la mezcla de reacción se añadió 850 mg (3,89 mmol) de bicarbonato de di-t-butilo, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se concentró entonces bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna. El material bruto se disolvió en una cantidad mínima del mismo solvente utilizado como eluyente en la columna. La columna se eluyó con $CHCl_3$-MeOH 28% NH_4OH (7:3:0,1). Las fracciones de la columna se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando el mismo sistema de solventes utilizado en la columna. Las placas se desarrollaron sumergiendo la placa en una solución de ácido fosfomolíbdico, seguido de calentamiento de la placa. El factor de retardo (Rf) del producto en $CHCl_3$-MeOH-28% NH_4OH (7:3:0,1) fue de 0,27. Las fracciones deseadas se combinaron y se concentraron. El residuo se suspendió entonces en 25 mL de diclorometano y se concentraron. La suspensión en diclorometano y el procedimiento de concentración se repitió dos veces más para proporcionar 481 mg (0,62 mmol, 51%) de 3,2',6'-trit-butoxicarbonil gentamicina C1a como un polvo blanco.

A 460 mg (0,602 mmol) de 3,2',6'-tri-t-butoxicarbonil gentamicina C1a se le añadió 9 mL de DMSO anhidro, seguido de 81 mL (0,70 mmol) de etiltrifluoroacetato. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 días y después se concentró bajo presión reducida. Durante la concentración, la temperatura del baño de agua se mantuvo por debajo de 45°C. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando una mezcla 9:1 de $CHCl_3$ y metanol como eluyente. Las fracciones que provienen de la columna se analizaron mediante TLC utilizando el mismo sistema de solventes. Las placas se desarrollaron sumergiendo la placa en una solución de ácido, , seguido de calentamiento de la placa. El Rf del producto en la mezcla 9:1 de $CHCl_3$ y metanol fue de 0,30. Las fracciones deseadas se combinaron y se concentraron. El residuo se suspendió en 20 mL de diclorometano y después se concentró. La suspensión en diclorometano y el procedimiento de concentración se repitió dos veces más para proporcionar 480 mg (0,55 mmol, 93%) de 3,2',6'-tri-t-butoxicarbonil-3"-N-(trifluoroacetil)gentamicina C1a (Z1) como un polvo blanco.

Una solución de 16 mg (0,019 mmol) de la amina de gentamicina: 2',3,6'-tri-t-butoxicarbonil-3"-(N-trifluoroacetil)-gentamicin[C1a] (Z1) se preparó en 1 mL de DMF anhidro y se añadió 100 mL de trietilamina. A esta solución se le añadió por goteo la solución anteriormente preparada de MPA- carbonato de N-hidroxisuccinimidilo (generada in situ). La mezcla de reacción se dejó en agitación bajo argón durante 4 horas y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante RP-HPLC preparativa utilizando un sistema de gradiente de agua/ acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se liofilizaron para proporcionar 15 mg (0,010 mmol, 57%) del conjugado de gentamicina-MPA protegido (N). ^{1}H-RMN: compatible. HR (+) ES MS: Calculado M+Na 1400,6446, Observado 1400,6495.

Ejemplo 50. Desprotección del conjugado de gentamicina-MPA completamente protegido, conjugado del éster metílico de 5'-[(N2',N3,N6'-tri-tbutoxicarbonil-N3"-trifluoroacetil-gentamicina[C1a]-N1-carbonil-oxi)-isoprenil]-MPA[OMEM] (N); al conjugado de gentamicina-MPA, conjugado de 5'-[(gentamicin(C1a]-N1-carbonil-oxi)-isoprenil]-MPA (R)

En referencia a las Figuras 23a y 23b, el conjugado de gentamicina-MPA completamente protegido (N, 1,0 mg, 0,73mmol) se disolvió en MeOH (200 mL) en un vial de 0,5 mL de capacidad con un pocillo en forma de V (Wheaton Reacti-Vial) que contenían de forma adicional una barra agitadora en forma de V. Se añadió una solución de hidróxido de litio en agua (100 mL de [LiOH monohidrato 20 mg/ mL en agua], equivalente a 2 mg de LiOH). El vial se tapó ligeramente y la solución clara se agitó a temperatura ambiente. La HPLC analítica mostró una progresión gradual de la reacción a través de un pico de reacción más rápido asignado como intermediario (Q), en el aún más rápido pico de reacción asignado como intermediario (P). Tras 3 días a temperatura ambiente, la HPLC analítica indicó que la reacción comprendía un compuesto de gran tamaño (P). La reacción se ajustó con cuidado a un pH de aproximadamente 6 con ácido fosfórico diluido (1 gota de H_3PO_4 al 85% en 2 mL de agua), con una precipitación de una pequeña cantidad de sólido (fosfato de litio). La mezcla se evaporó hasta la sequedad bajo un vacío elevado. El residuo se trituró con MeOH, se filtró, el filtrado se evaporó bajo presión reducida, el residuo se re-disolvió en un poco de MeCN-agua 1:1 y se purificó mediante RP-HPLC semi-preparativa (Columna: Vydac 218TP510; 300Å, 5μ, C18, 10x250 mm. Guarda: Vydac 218GK54. Gradiente: 5% C = MeCN que contenían TFA 0,1%] a los 0 minutos, aumentando a 50% de C a los 10 minutos, aumentando al 75% de C a los 30 minutos, aumentando al 100% de C a los 35 minutos, después cayendo al 5% de C a los 40 minutos; en A = agua que contenían TFA 0,1%]; tasa de flujo = 3 mL/ min). Los picos que contenían el producto deseado (tiempo de retención tR] ~ 20 min.) se recogieron y se liofilizaron para proporcionar 5'-[(N2',N3,N6'-tri-butoxicarbonilgentamicina-[C1a]-N1-carbonil-oxi)-isoprenil]-MPA[OMEM] (P, 0,5 mg) como un sólido blanco. ^{1}H-RMN: compatible. LC/ MS: M+H 1268,6.

En otro experimento, 3,0 mg de (N) en 500 mL de MeOH se trató con 5 mg de LiOH en 250 mL de agua de forma similar a como se ha descrito anteriormente durante 3 días a temperatura ambiente. El procedimiento de síntesis como se ha descrito anteriormente proporcionó un residuo que se purificó mediante TLC analítica (20 x 20 cm; espesor de sílice 0,025 cm; 2 placas), eluyendo con MeOH 15% en $CHCl_3$. La banda de producto (Rf~ 0,4) se recortó, el sílice se lavó /eluyó con MeOH al 30% en $CHCl_3$, los lavados se evaporaron hasta la sequedad y el residuo se re-purificó mediante HPLC semi-preparativa como se ha descrito anteriormente. Los picos de producto se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el intermediario gentamicina[$(BOC)_3$]NHMe]-MPAOMEM]COOH] (P, 1,1 mg) como un sólido blanco. ^{1}H-RMN: compatible.

El conjugado 5'-[(N2',N3,N6'-tri-t-butoxicarbonil-gentamicina-[C1a]-N1-carbonil-oxi)-isoprenil]-MPA-[OMEM] (P, 1,1 mg) se disolvió en CH_2Cl_2 seco (200 mL) bajo argón y con enfriamiento en un baño de hielo-agua (~4 °C). A la solución en agitación (barra agitadora micro magnética) se le añadió una solución de ácido trifluoroacético (TFA, 20 mL) en CH_2Cl_2 seco (60 mL) en tres porciones durante ~ 1 minuto, y la reacción se agitó durante 10 minutos con enfriamiento. La reacción se evaporó hasta la sequedad mediante aspiración directa bajo vacío elevado mientras se mantenía el frío. El residuo se lavó con un poco de CH_2Cl_2 seco y se re-aspiró bajo un vacío elevado. El residuo se disolvió en ~ 0,5 mL de MeCN, se retiró una alícuota, y el resto se aspiró bajo vacío elevado hasta la sequedad. La alícuota retirada se analizó mediante HPLC analítica (gradiente: como el proporcionado anteriormente, pero a 1 mL/ min.), que indicó la presencia de gran cantidad de material de partida (P) tR ~ 18,1 min.] junto con nuevos picos de producto en tiempos de retención más cortos. La inspección cuidadosa del pico correspondiente al material de partida indicó (UV) que el grupo protector MEM también se había eliminado parcialmente, con el material des-MEM

casi co-reacciona con el material de partida presente. El residuo de la reacción se re-disolvió en CH_2Cl_2 seco (200 mL) y se retrató con TFA en CH_2Cl_2 exactamente como antes (segundo tratamiento), pero con agitación durante 20 minutos. La aspiración y el manejo como se ha descrito anteriormente y el análisis por HPLC de la alícuota de la reacción mostró un descenso progresivo de (P) y la aparición de una cascada de picos de reacción más rápidos. Un tercer tratamiento con TFA/ CH_2Cl_2 como se ha descrito anteriormente (30 min./ ~4°C) y análisis por HPLC; seguido de un cuarto tratamiento con TFA (30 mL)/ CH_2Cl_2 (90 mL, 30 min./ ~4°C) y análisis por HPLC; y un quinto tratamiento final con TFA (30 mL)/ CH_2Cl_2 (90 mL, 2 horas/ ~4°C) y análisis por HPLC; mostraron de forma progresiva la desaparición de todo el material de partida (P) tR ~ 18,1] y una cascada de picos de intermediarios de rápida eliminación que cambiaban a lo largo del tiempo y tendían a acumularse en un pico principal que se eliminaba en primer lugar [tR ~ 10,4 min.]. No se observó una cantidad significativa del 5'-isoprenil[OH]-MPA parental (3A, formado a partir de la ruptura concomitante no deseada del carbamato alílico del enlazante), comparado con el material conocido. Los ajustes de los gradientes en los análisis de HPLC analítico finales, confirmaron en ambos casos la presencia de una cantidad negligible de (3A), si es que estaba presente, y también permitió una mejor expansión de los picos. La reacción se aspiró hasta la sequedad bajo un vacío elevado, se re-disolvió en MeCN-agua 3:1, y se purificó mediante RP-HPLC semi-preparativo (Columna: Vydac 218TP510; 300Å, 5μ, C18, 10 x 250 mm. Columna de protección: Vydac 218GK54. Gradiente: 0% [TFA al 0,1% que contenía C = MeCN] a los 0 min., aumentando hasta un 75% de C a los 30 min., aumentando hasta un 100% de C a los 35 min., y luego bajando hasta un 0% de C a los 40 min.; en [TFA al 0,1% que contenía A = agua]; tasa de flujo = 3 mL/ min., 3 ciclos). Los picos de producto [tR ~ 17,8 min.] se recogieron y se evaporaron hasta la sequedad bajo vacío elevado (a < 25°C) para proporcionar el conjugado gentamicina-MPA (enlazado carbamato, R, <0,5 mg) como un sólido blanco. ^{1}H-RMN: compatible. LR(+)FAB MS: M+H 880,4. HR(+)FAB MS: calculado M+H 880,4555, observado 880,4553.

En un método alternativo para la desprotección de (N) a (R), se disolvió gentamicina-MPA (N, 21,0 mg) totalmente protegida en MeOH (4,2 mL) y se trató con una solución de LiOH (42 mg en 2,1 mL de agua). La reacción clara se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 4 d. tras lo cual una HPLC analítica mostró que la reacción se había completado en gran medida. La mezcla se acidificó con ácido fosfórico diluído (2 gotas de H_3PO_4 al 85% en 2 mL de agua) hasta aprox. pH 5. La mezcla, que en ese momento contenía algo de fosfato de litio precipitado, se agitó y removió, se diluyó con agua y MeOH, se reajustó el pH hasta aprox. pH 4-5 con más ácido fosfórico diluido y la mezcla se agitó y removió durante un total de casi 2 horas. La mezcla se evaporó hasta la sequedad bajo presión reducida, y luego bajo un vacío elevado. El residuo sólido se trituró con MeOH, los sólidos se separaron por filtración, y los filtrados se evaporaron hasta la sequedad para conseguir sólidos oleosos. La HPLC analítica indicó que la mezcla de producto contenía MPA-gentamicin totalmente desprotegida (R) junto con cantidades menores de una cascada de varias especies de intermediarios parcialmente desprotegidos, comparado con el experimento anterior. El material se disolvió en MeCN-agua 1:1 y se purificó mediante RP-HPLC preparativa (gradiente del 0% creciente hasta el 75% a lo largo de 40 min., luego isocrático al 75% hasta los 60 min., y luego creciente hasta el 100% a lo largo de 20 min. de [ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%/ MeCN] en [TFA al 0,1%/ agua]; tasa de flujo = 10 mL/ min.) para proporcionar, a partir del pico de eliminación en primer lugar (principal) tras la liofilización el producto gentamicina-MPA (R, 4,8 mg) deseado como un sólido blanco. ^{1}H-NMR: compatible. LR(+)FAB MS: compatible. HR(+)FAB MS: calculado M+H 880,4555, observado 880,4561.

Ejemplo 51 Hidrólisis parcial de la base de (N): aislamiento del intermediario conjugado del éster metílico de 5'-[($N^{2'}$,N^3,$N^{6'}$-tri-^{t}butoxicarbonil-gentamicin–[C1a]-N1-carboniloxi)-isoprenil]-MPA[OMEM] (Q)

En otro experimento, se trató 1,0 mg de (N) en 200 μL de DMF con 2 mg de LiOH en 100 μL de agua de forma similar a la que se ha descrito anteriormente, diluyendo con 20 μL adicionales de agua para obtener una solución clara. La HPLC analítica indicó que el intermediario (Q) se formó bastante rápidamente, pero la posterior reacción hasta (P) fue muy lenta. Tras su agitación durante toda la noche a temperatura ambiente, la reacción se detuvo, se realizó la síntesis como se ha descrito anteriormente y se purificó mediante HPLC semi-preparativa como se ha descrito anteriormente. Los picos que contenían producto [tR ~ 22 1/2 min.] se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el intermediario parcialmente desprotegido (Q, < 0,5 mg). 1H-NMR: compatible.

Ejemplo 52. Preparación del conjugado protegido sentamicin-MPA (enlazado amida), conjugado del éster metílico de 5'-[($N^{2'}$,N^3,$N^{6'}$-tri-^{t}butoxicarbonil-N^3-trifluoroacetil-gentamicin[C1a]-N^1-tereftaloil)-amino-isoprenil]-MPA[OMEM] (S)

A 15 g (73,8 mmol) de cloruro de tereftaloilo se añadieron 300 mL de diclorometano. La mezcla se dejó en agitación a 0°C durante 10 minutos bajo una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción se añadieron 30 g (0,26 mol) de N-hidroxisuccinimida, seguido de la adición gota a gota de 30 mL (0,22 mol) de trietilamina a 0°C. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y luego se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El sólido se separó mediante filtración y el residuo se lavó con 200 mL de diclorometano. El residuo se resuspendió en 300 mL de diclorometano y se dejó en agitación durante 10 minutos. El sólido se filtró y secó para proporcionar 24,12 g (66,9 mmol, 91%) del producto tereftalato de 1,4-di-N-hidroxisuccinimida como un polvo blanco.

A 64,5 mg de tereftalato de 1,4-di-N-hidroxisuccinimida se añadieron 6 mL de DMF anhidro para obtener una solución de éster de di-N-hidroxisuccinimida (di-NHS). En otro recipiente se añadieron 64,5 mg (0,17 mmol) de (Z1), 6 mL de DMF anhidro, y 128 μL (0,89 mmol) de trietilamina. Esta solución de gentamicina amina se añadió a la solución de éster de di-NHS gota a gota bajo una atmósfera de argón. La mezcla se dejó en agitación a temperatura

ambiente durante 48 h y luego se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando una mezcla 9:1 de acetato de etilo y hexano como eluyente. Las fracciones provenientes de la columna se analizaron mediante TLC, detectando el producto deseado bajo una longitud de onda corta de UV. La Rf del producto en el mismo sistema de solvente utilizado para la columna fue de 0,36. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron, y después se purificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un gradiente de reacción a 10 mL/ min. Las fracciones deseadas se combinaron, se concentraron en el evaporador rotativo a temperatura ambiente y después se liofilizaron para proporcionar 49 mg (0,044 mmol, 26%) de éster de 3,2',6'-tri-t-butoxicarbonil-3"-N-(trifluoroacetil) gentamicina C1a-N1 posición--aromática-sustituida NHS (Z) como un polvo blanco.

A 24 mg (0,047 mmol) de amina de MPA (B) se le añadió 1,7 mL de DMF anhidro seguido de 100 mL de trietilamina. A la mezcla de reacción se le añadió una solución de 26,2 mg (0,023 mmol) del éster de gentamicina NHS: éster de 2',3,6'-tri-t-butoxicarbonil-3"(N-trifluoroacetil)-gentamicina-[C1a]-N1-tereftaloil-NHS (Z) en 1,8 mL de DMF anhidro. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas bajo argón. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (placas de 20 x 20 cm x 0,025 cm de espesor de sílice) utilizando metanol al 5% en acetato de etilo para proporcionar 19 mg (0,012 mmol, 54%) de conjugado de MPA-gentamicina protegido (S) como un sólido blanco. ^{1}H-RMN: compatible. LC/ MS: M+H 1504,6.

Ejemplo 53. Preparación de conjugado parcialmente protegido de gentamicina-MPA (enlace amida), conjugado de 5'-[(N2',N3,N6'-tri-t-butoxicarbonil-gentamicina-[C1a]-N1-tereftaloil)-amino-isoprenil]-MPA-[OMEM] (T)

A 12 mg (0,008 mmol) de conjugado de MPA-gentamicina (protegido) (S) se le añadió 1,5 mL de metanol y 24 mg de hidróxido de litio monohidrato y 750 mL de agua. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió una cantidad adicional de 24 mg de hidróxido de litio monohidrato en 750 mL de agua. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 días más y después se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida. Se le añadió 2 mL de agua al residuo y el pH se ajustó a 6-7. La solución resultante se concentró y el residuo se mezcló con 3 x 50 mL de metanol y se filtró. El filtrado se concentró hasta la sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (placas de 20 x 20 cm x 0,025 cm de espesor de sílice) utilizando acetato de etilo al 50% en metanol para proporcionar 7 mg (0,005 mmol, 70%) de conjugado de gentamicina-C1a-MPA protegido (T) como un polvo blanco. ^{1}H-RMN: compatible. LC/ MS: M+H 1372,6.

Ejemplo 54. Preparación de conjugado de gentamicina-MPA (enlace amida), conjugado de 5'-[(gentamicina[C1a]-N1-terftaloil)-aminoisoprenil]-MPA (enlace amida, U)

A 7 mg (0,005 mmol) de conjugado de gentamicina-C1a-MPA protegido (T) se le añadió 1 mL de diclorometano seco y la solución se enfrió a 0 °C. A la mezcla de reacción se añadió 500 mL de ácido trifluoroacético y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos mientras se calentaba a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante RP-HPLC semi-preparativa (C-18, Vydac 218TP510, 10 mm x 250 mm; Vydac 218GK54 módulo de guarda) utilizando un sistema de gradiente de agua/ acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético 0,1% (tasa de flujo = 3 mL/ min). Las fracciones que contenían producto se combinaron y se liofilizaron para proporcionar 3 mg (0,003 mmol, 60%) de U como un polvo blanco. ^{1}H-RMN: compatible. LR (+) FAB MS: M+H 982. HR-ES MS: Calculado $(M+2H)^{2+}$ 492,2523, observado 492,2528.

Ejemplo 55. Preparación de éster del ácido fenitoin-3-butírico NHS (W)

El ácido 5,5-difenilhidantoin-3-butírico (V, ácido fenitoin-3-butírico) se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en ES 389999.

A una solución de 1,5 g (4,43 mmol) de ácido 5,5-difenilhidantoin-3-butírico (V) en 10 mL de piridina seca y 5 mL de DMF seco bajo argón se le añadió 2,52 g (8,87 mmol) de oxalato de disuccinimidilo en un lote como un sólido. Tras agitar a temperatura ambiente durante 18h el solvente se eliminó, se añadió fosfato potásico 50 mM (pH 10), y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 150 mL). Los extractos orgánicos se evaporaron para proporcionar 1,29 g (a partir de las capas de acetato de etilo) y 0,61 g (a partir de las capas de CH_2Cl_2) de sólidos blancos. Los sólidos combinados se disolvieron en 500 mL de acetato de etilo que contenía DMF al 2% con calentamiento (~ 30°C y se agitó sobre $NaHCO_3$ saturado acuoso durante 30 minutos. La capa orgánica se aisló y se agitó de nuevo con $NaHCO_3$ saturado acuoso durante 30 minutos. La capa orgánica se secó entonces (Na_2SO_4), se filtró, se evaporó y se secó al vacío para proporcionar 1,61 g del éster NHS deseado (W). ^{1}H-RMN: compatible. LR (+) APCI MS: 436 (M+H). Microanálisis: Calculado para $C_{23}H_{21}N_3O_6$ • 1/10 $CH_3COOC_2H_5$: C, 63,27; H, 4,95; N, 9,46%. Observado: C, 63,25; H, 4,98; N, 9,46%.

Ejemplo 56. Preparación de conjugado de éster metílico de 5'-[(fenitoin-3-butiramido)-isoprenil]-MPA[OMEM] (X)

A una solución de 37 mg (0,073 mmol) de MPA-5'-isoprenilamina (B), del Ejemplo 45, en 5 mL de DMF anhidro se le añadió 200 μL de trietilamina. A la mezcla de reacción se le añadió por goteo una solución de 52 mg (0,12 mmol) de éster del ácido fenitoin-3-butírico NHS (W) del Ejemplo 55 en 1 mL de DMF anhidro. La solución resultante se dejó

en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas y después se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando acetato de etilo al 50% en hexano para proporcionar 48 mg del producto deseado que contenía algunas impurezas. La mezcla se re-purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (placas de 20 x 20 cm x 0,2 cm espesor de sílice) utilizando hexano al 5% en acetato de etilo para proporcionar 26 mg (0,031 mmol, 61%) del conjugado protegido (X). ^{1}H-RMN: compatible. LC/ MS: M+H 826,3.

Ejemplo 57. Preparación de conjugado de fenitoin-MPA, conjugado de 5'-[(fenitoin-3-butiramido)-isoprenil]-MPA (Y)

A 22 mg (0,026 mmol) del conjugado protegido (X), del Ejemplo 56, se le añadió 4,5 mL de metanol y 2 mL de agua seguido de 100 mg de hidróxido de litio monohidrato. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 72 horas y después se concentró bajo presión reducida. Al residuo se le añadió 1 mL de agua y el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 6 utilizando ácido fosfórico diluido (1 mL de H_3PO_4 al 85% en 9 mL de agua). La mezcla de reacción resultante se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se trituró con 15 mL de metanol y los sólidos inorgánicos se eliminaron por filtración. El filtrado se concentró y se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (20 x 20 cm x 0,025 espesor de sílice) utilizando acetato de etilo al 50% en hexano para proporcionar 12 mg (0,016 mmol, 63%) de conjugado de fenitoin-MPA (Y). ^{1}H-RMN: compatible. HR-ES (+) MS: Calculado para M+Na 746,3048. Observado 746,3044.

Ejemplo 58. Ensayos para fenitoína y gentamicina

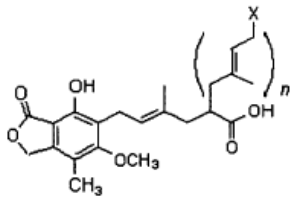
Los ensayos para fenitoína y gentamicina se realizaron con un aparato HITACHI 917 como sigue: se añadieron 3 mL de muestra a una cubeta y se añadieron 150 mL de reactivo de enzima, se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 5 minutos, después se añadió 150 mL de reactivo de anticuerpo y se mezcló. La tasa de absorbancia a 340 nm se monitorizó durante 9-10 minutos tras la adición del reactivo de anticuerpo. Se construyó una curva de calibración utilizando estándares que contenían cantidades conocidas de fenitoína o gentamicina. Los valores de fenitoína o gentamicina se calcularon mediante el analizador HITACHI 917. Se utilizaron los calibradores de fenitoína o gentamicina INTEGRA de Roche y un cartucho de reactivos de fenitoína o gentamicina INTEGRA FP de Roche con un analizador INTEGRA 700 de Roche para los estudios de comparación del método. Se utilizaron estadísticas de regresión de Passing/ Bablock. Las muestras de paciente fue de plasma. La composición de reactivo de enzima y reactivos de anticuerpo se describen a continuación:

Formulación del reactivo con enzima	
Tris	100 mM
KCL	100 mM
IMP	80 mM
TCEP	4 mM
EDTA	6 mM
Derivados de fenitoin-isoprenil-MPA (racémico) o gentamicinisoprenil-MPA (racémico)	1,47 μM
SUTTOCIDE A	4 mM
MAB	0,1 mg/ mL
IMPDH-II	Ajustar a la tasa
pH 8,0	

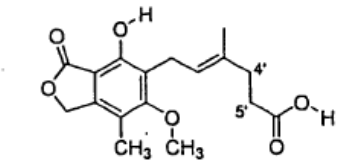
Formulación del reactivo con anticuerpo	
NAD	1 mM
SUTTOCIDE A	4 mM
NP-40	0,175%
pH 6,0	

REIVINDICACIONES

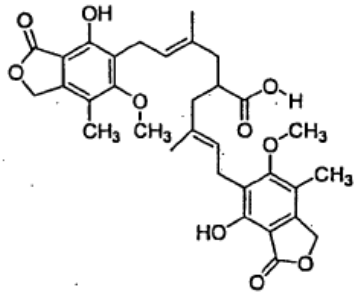
1. Un conjugado ligando-inhibidor con una estructura



en la que n = 1-2 y
x es -NH-CO-$(CH_2)_3$-fenitoína.



MPA



MPA-MPA

Figura 1

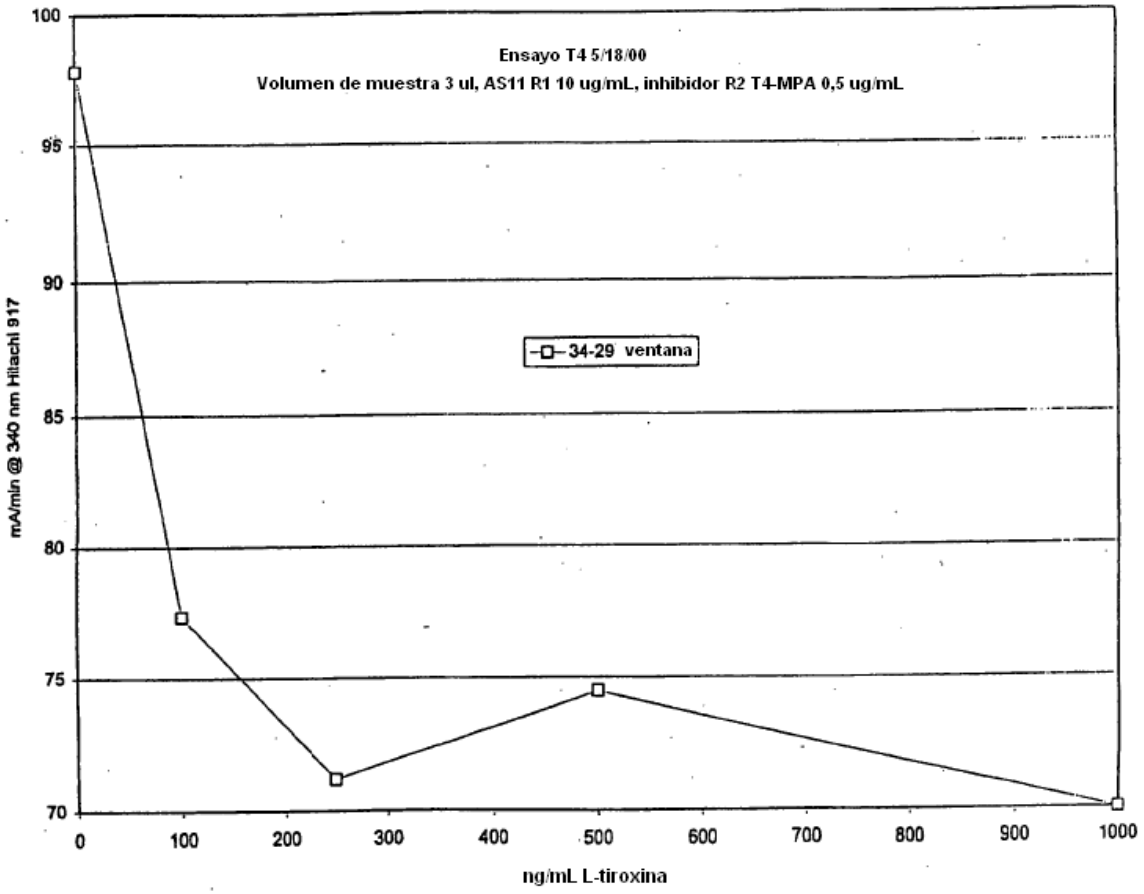

Ensayo T4 5/18/00
Volumen de muestra 3 ul, AS11 R1 10 ug/mL, inhibidor R2 T4-MPA 0,5 ug/mL
34-29 ventana
mA/min @ 340 nm Hitachi 917
ng/mL L-tiroxina
100
95
90
85
80
75
70
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000

Figura 2

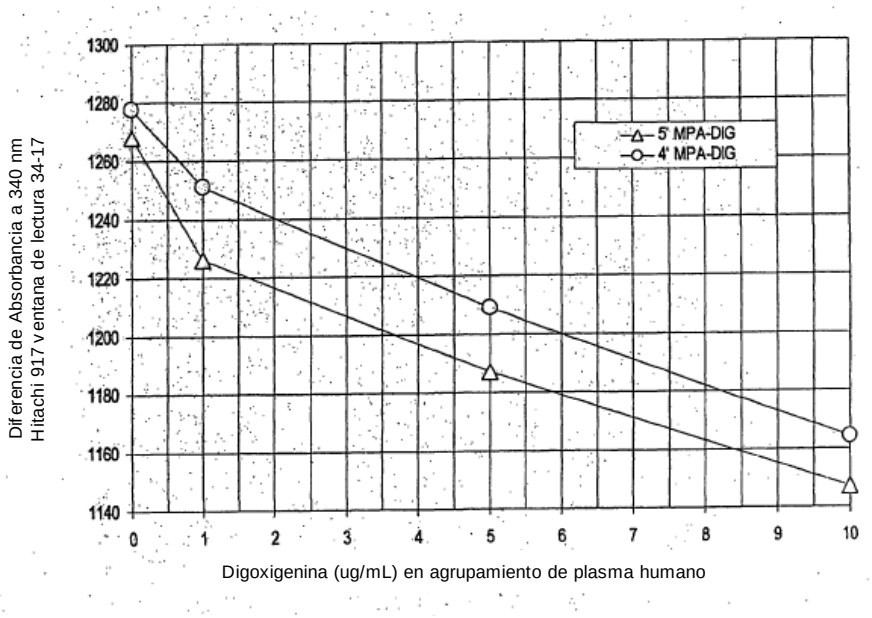

Diferencia de Absorbancia a 340 nm
Hitachi 917 ventana de lectura 34-17
1300
1280
1260
1240
1220
1200
1180
1160
1140
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
5' MPA-DIG
4' MPA-DIG
Digoxigenina (ug/mL) en agrupamiento de plasma humano

Figura 3

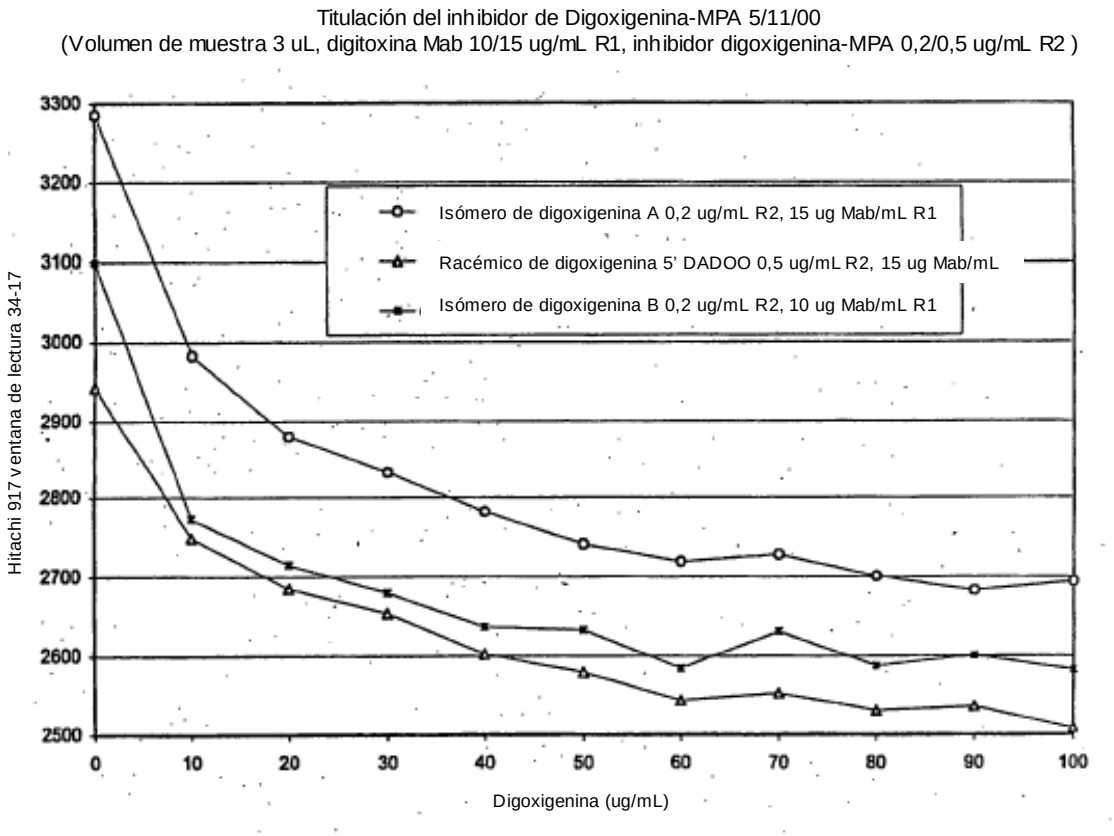

Titulación del inhibidor de Digoxigenina-MPA 5/11/00
(Volumen de muestra 3 uL, digitoxina Mab 10/15 ug/mL R1, inhibidor digoxigenina-MPA 0,2/0,5 ug/mL R2)
Hitachi 917 ventana de lectura 34-17
Digoxigenina (ug/mL)
Isómero de digoxigenina A 0,2 ug/mL R2, 15 ug Mab/mL R1
Racémico de digoxigenina 5' DADOO 0,5 ug/mL R2, 15 ug Mab/mL
Isómero de digoxigenina B 0,2 ug/mL R2, 10 ug Mab/mL R1
3300
3200
3100
3000
2900
2800
2700
2600
2500
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

Figura 4

Ensayo de teofilina 6/12/00 15 MAB R2, 25 MAB R2. Inhibidor 0,5 ug/mL, volumen de la muestra 3 uL

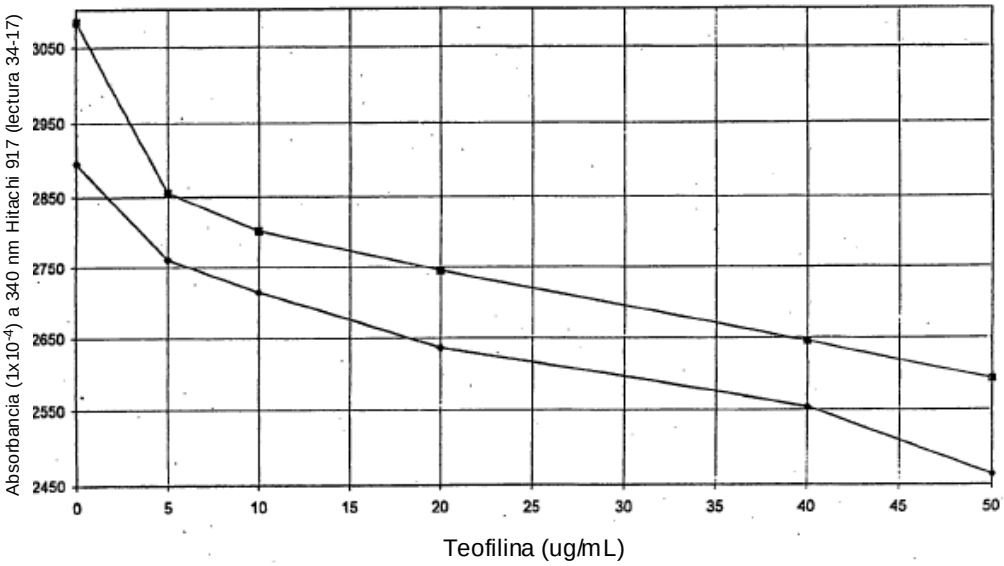


Figura 5

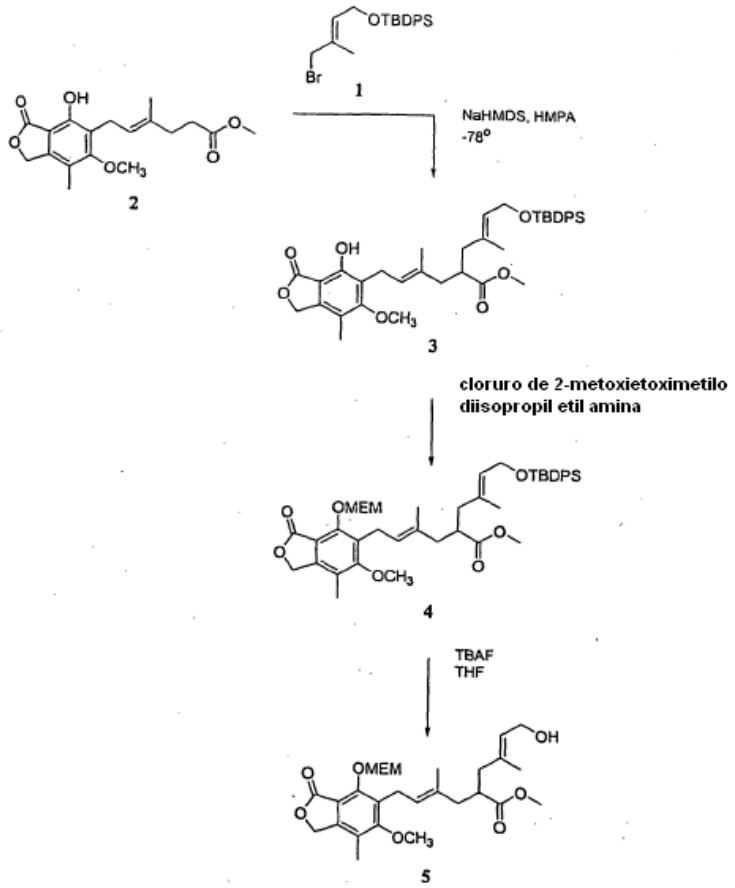

OTBDPS
Br
1
NaHMDS, HMPA
-78°
OH
OCH3
2
OTBDPS
OH
OCH3
3
cloruro de 2-metoxietoximetilo
diisopropil etil amina
OTBDPS
OMEM
OCH3
4
TBAF
THF
OH
OMEM
OCH3
5

Figura 6

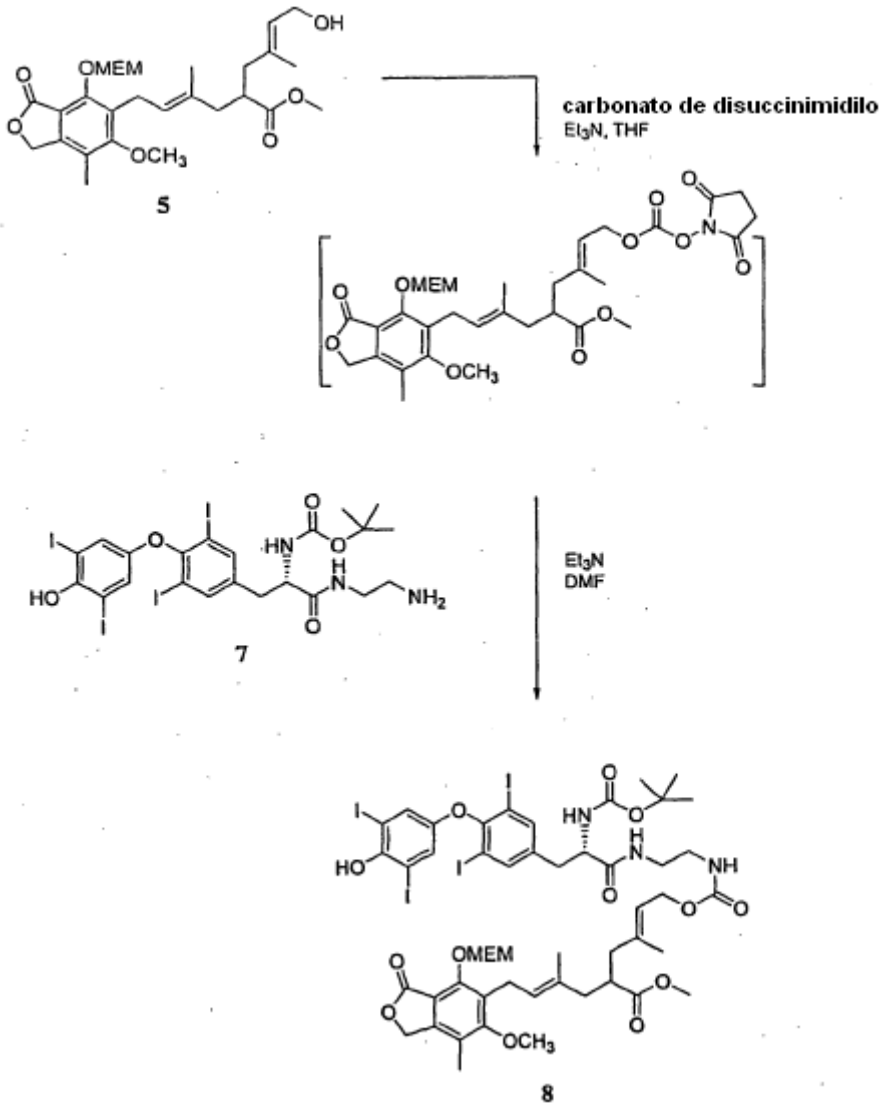

OH
OMEM
OCH3
5
carbonato de disuccinimidilo
Et3N, THF
OMEM
OCH3
HO
HN
NH2
7
Et3N
DMF
HO
HN
NH
OMEM
OCH3
8

Figura 7

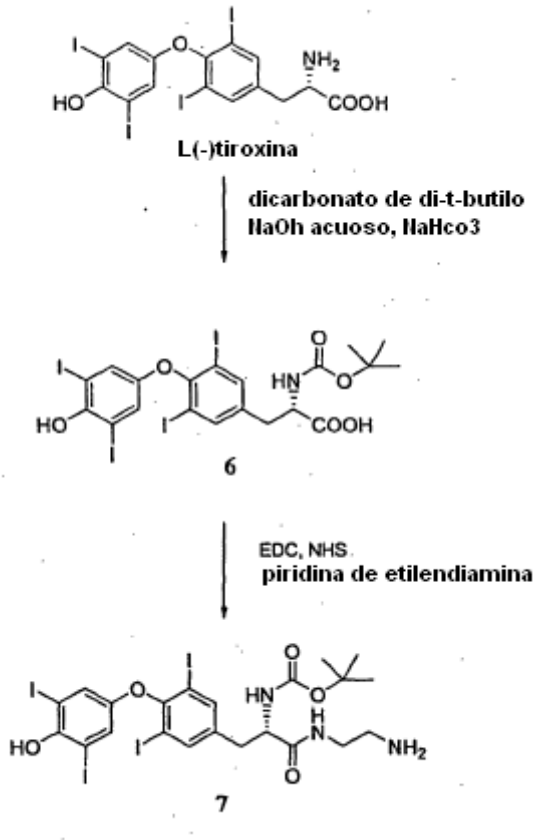

L(-)tiroxina
dicarbonato de di-t-butilo
NaOh acuoso, NaHco3
6
EDC, NHS
piridina de etilendiamina
7

Figura 8

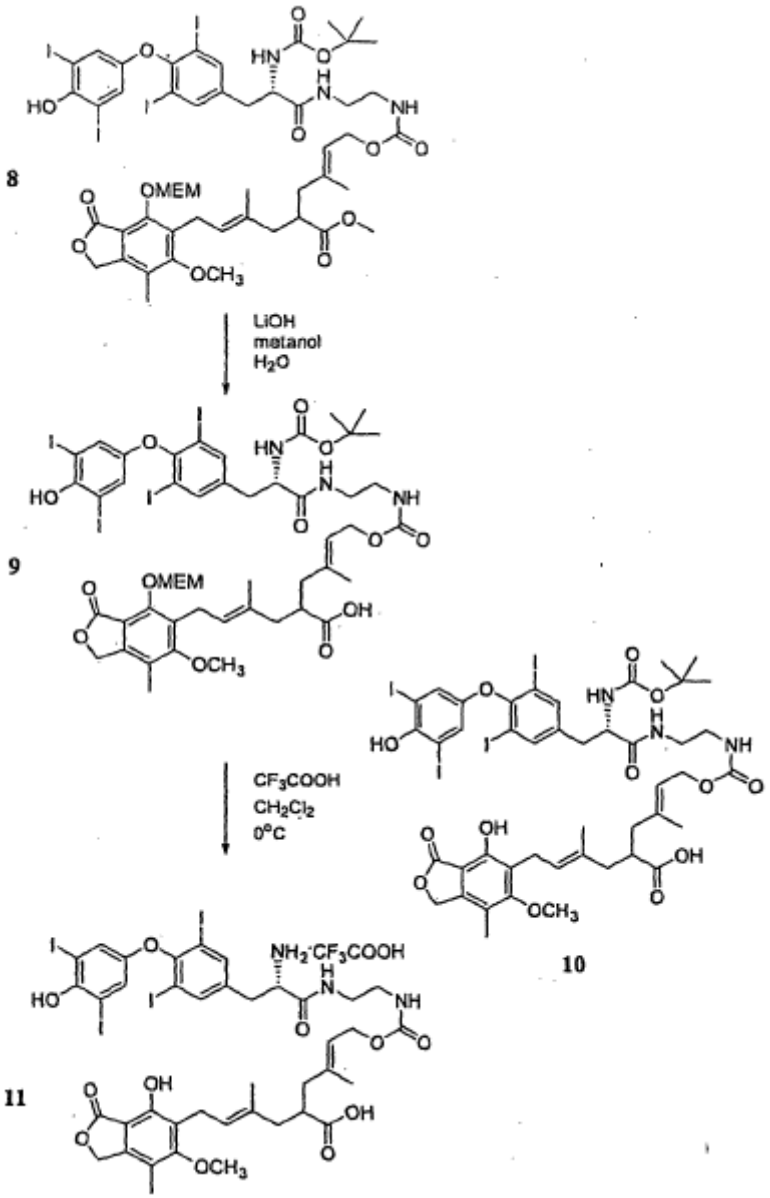

8
OMEM
OCH3
LiOH
metanol
H2O
9
OMEM
OCH3
CF3COOH
CH2Cl2
0°C
10
11
NH2·CF3COOH
OCH3

Figura 9

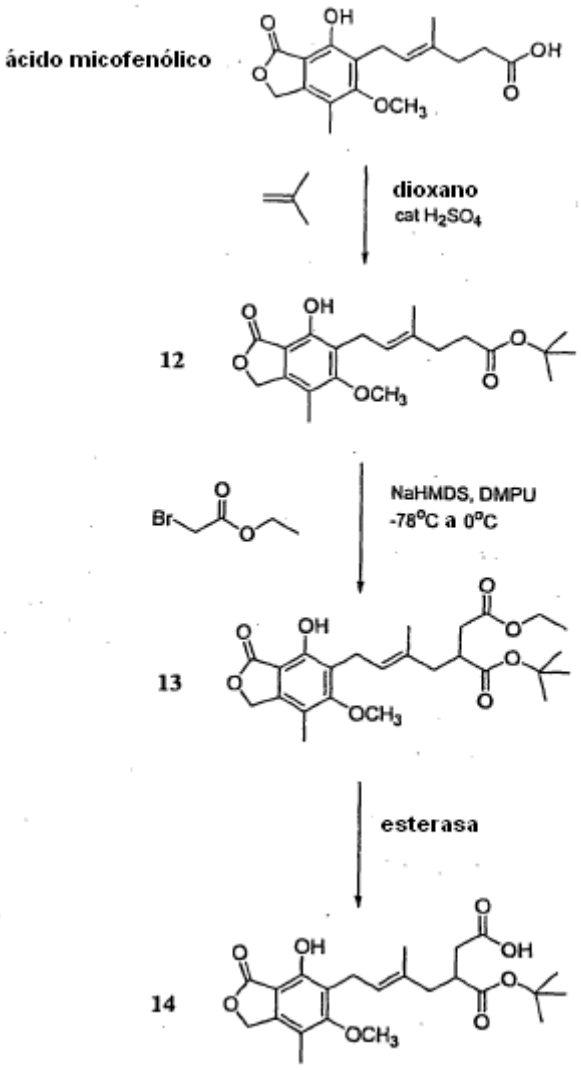

ácido micofenólico
dioxano
cat H_2SO_4
12
NaHMDS, DMPU
-78°C a 0°C
13
esterasa
14

Figura 10

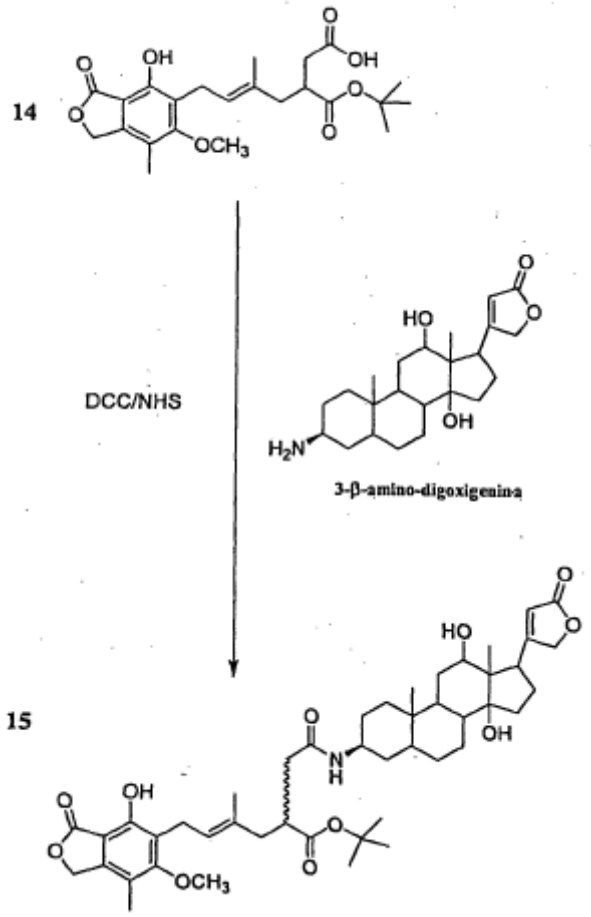

14
OH
O
OH
O
O
O
OCH3
DCC/NHS
HO
O
O
OH
H2N
3-β-amino-digoxigenina
15
HO
O
O
OH
N
H
O
OH
O
O
O
OCH3

Figura 11

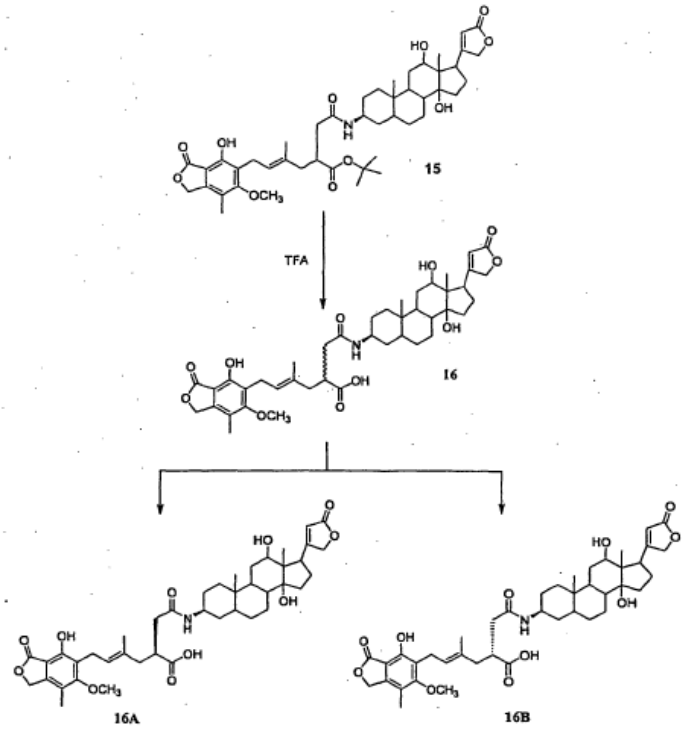
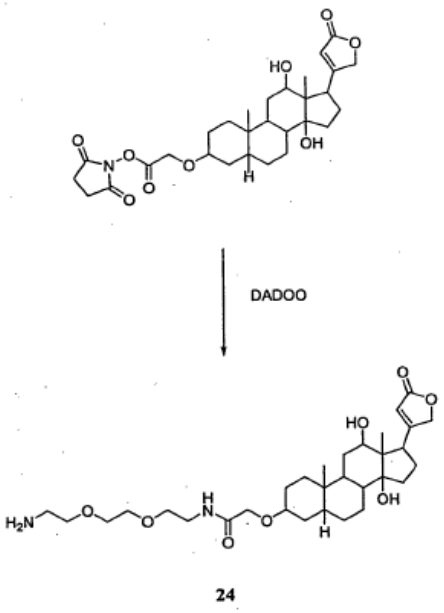


Figura 12



24

Figura 13

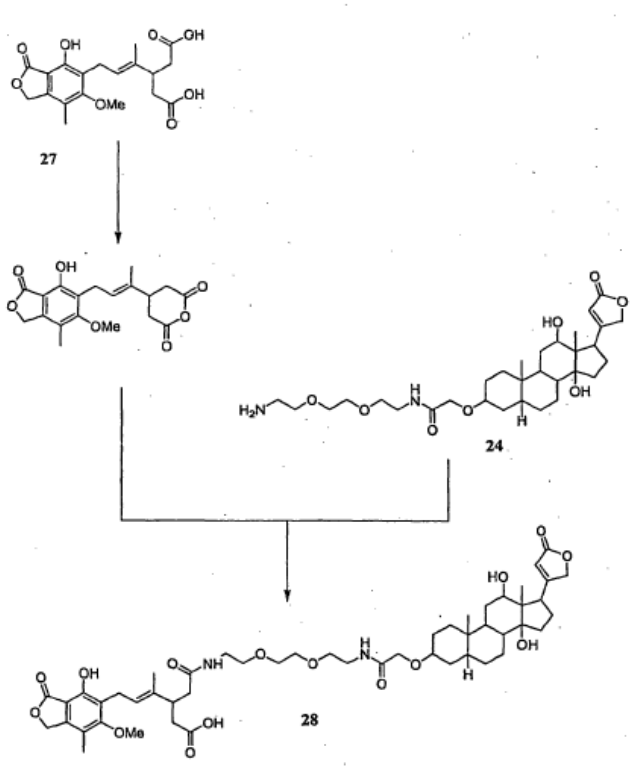


Figura 14

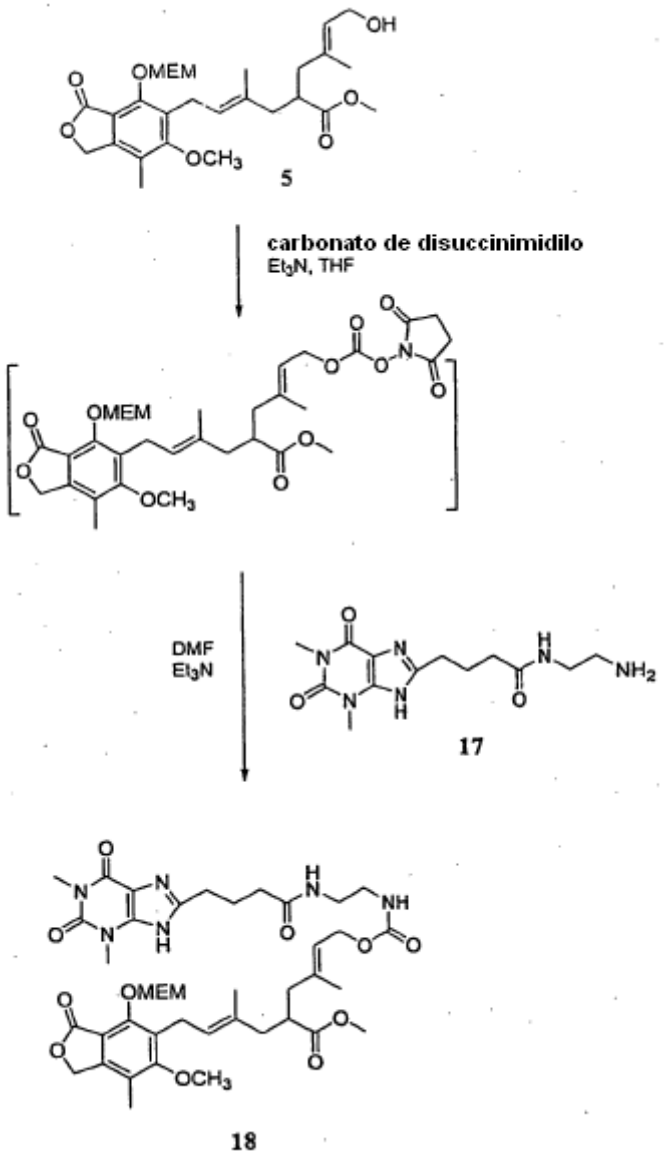

OH
OMEM
OCH3
5
carbonato de disuccinimidilo
Et3N, THF
OMEM
OCH3
DMF
Et3N
NH2
17
NH
OMEM
OCH3
18

Figura 15

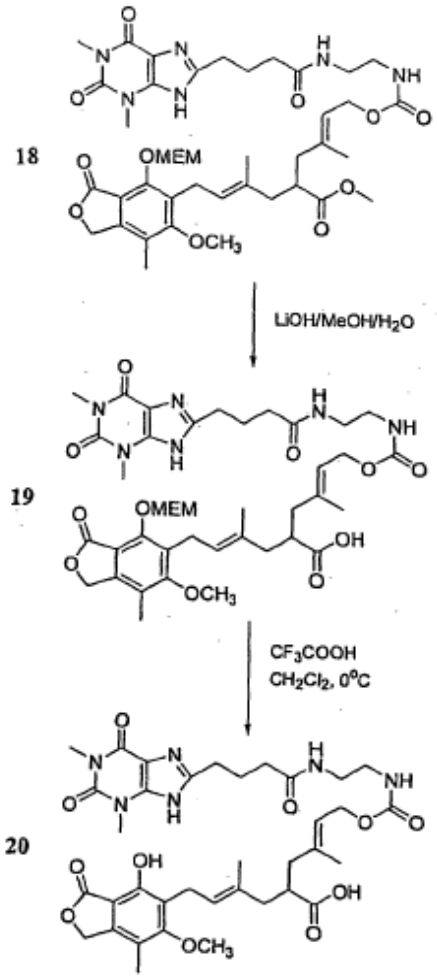

18
OMEM
OCH3
LiOH/MeOH/H2O
19
OMEM
OH
OCH3
CF3COOH
CH2Cl2, 0°C
20
OH
OH
OCH3

Figura 16

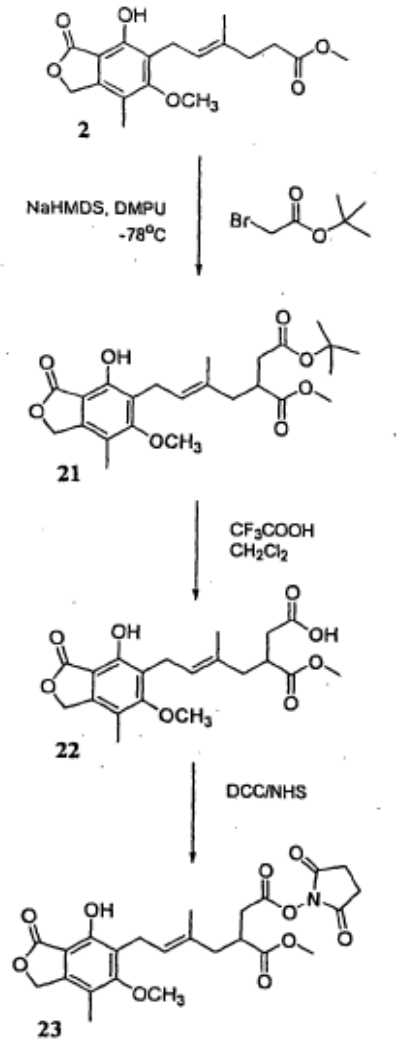

OH
O
O
OCH3
O
O
2
NaHMDS, DMPU
-78°C
Br
O
O
21
CF3COOH
CH2Cl2
OH
22
DCC/NHS
N
23

Figura 17

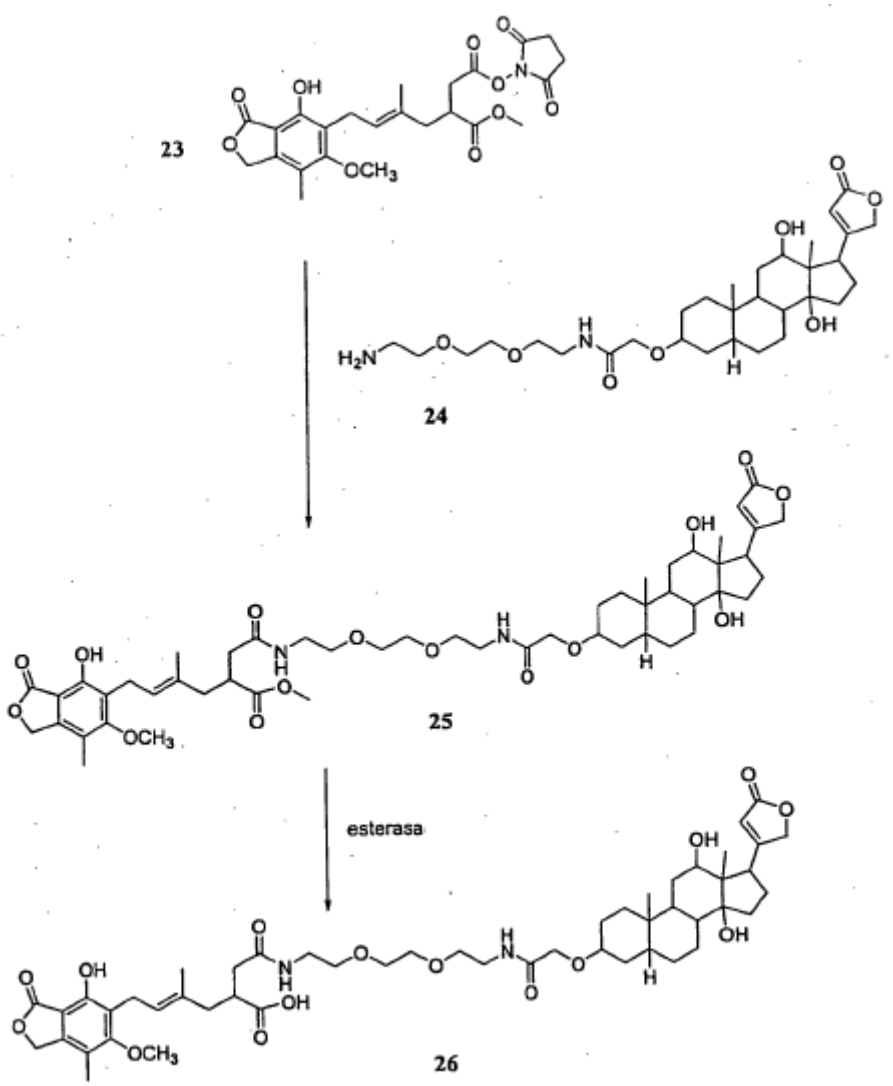


Figura 18

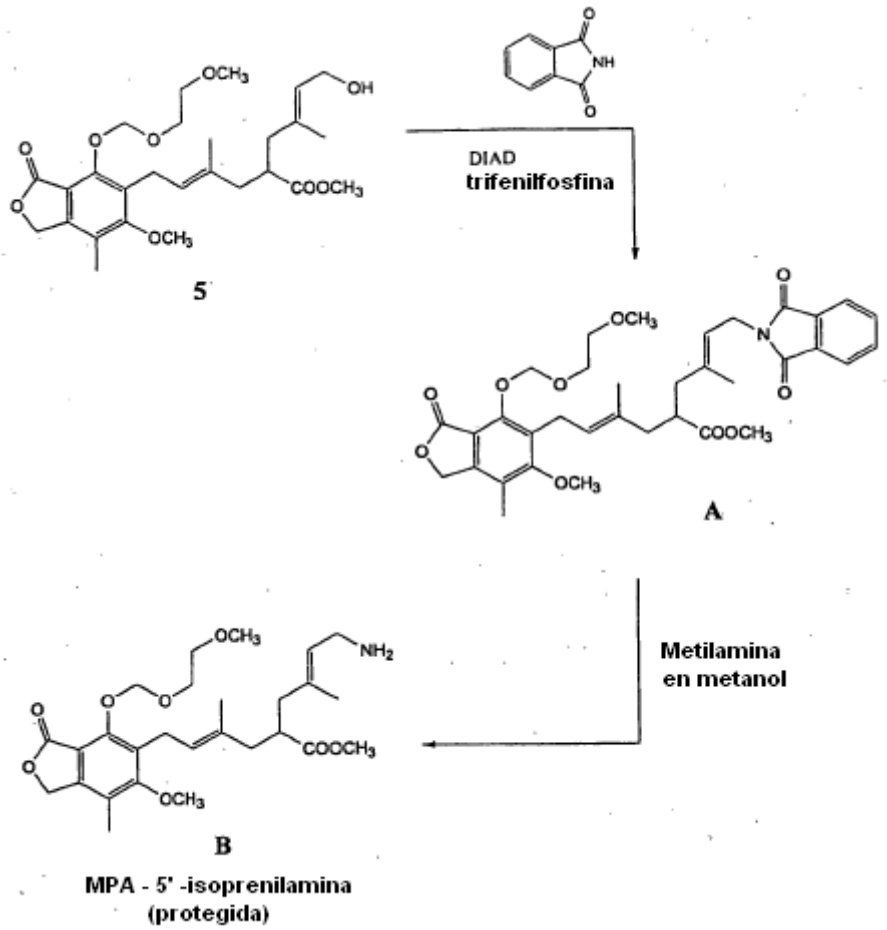

DIAD
trifenilfosfina
Metilamina
en metanol
5
A
B
MPA - 5' -isoprenilamina
(protegida)

Figura 19

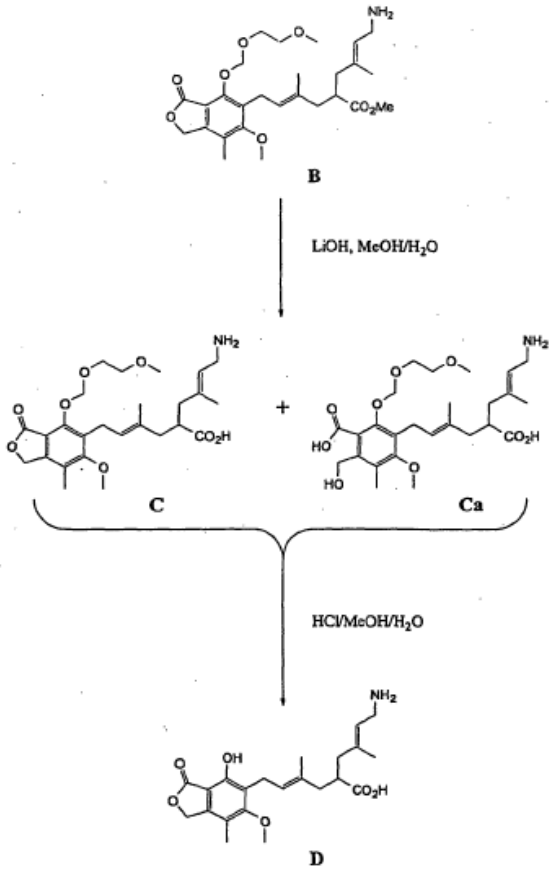


Figura 20

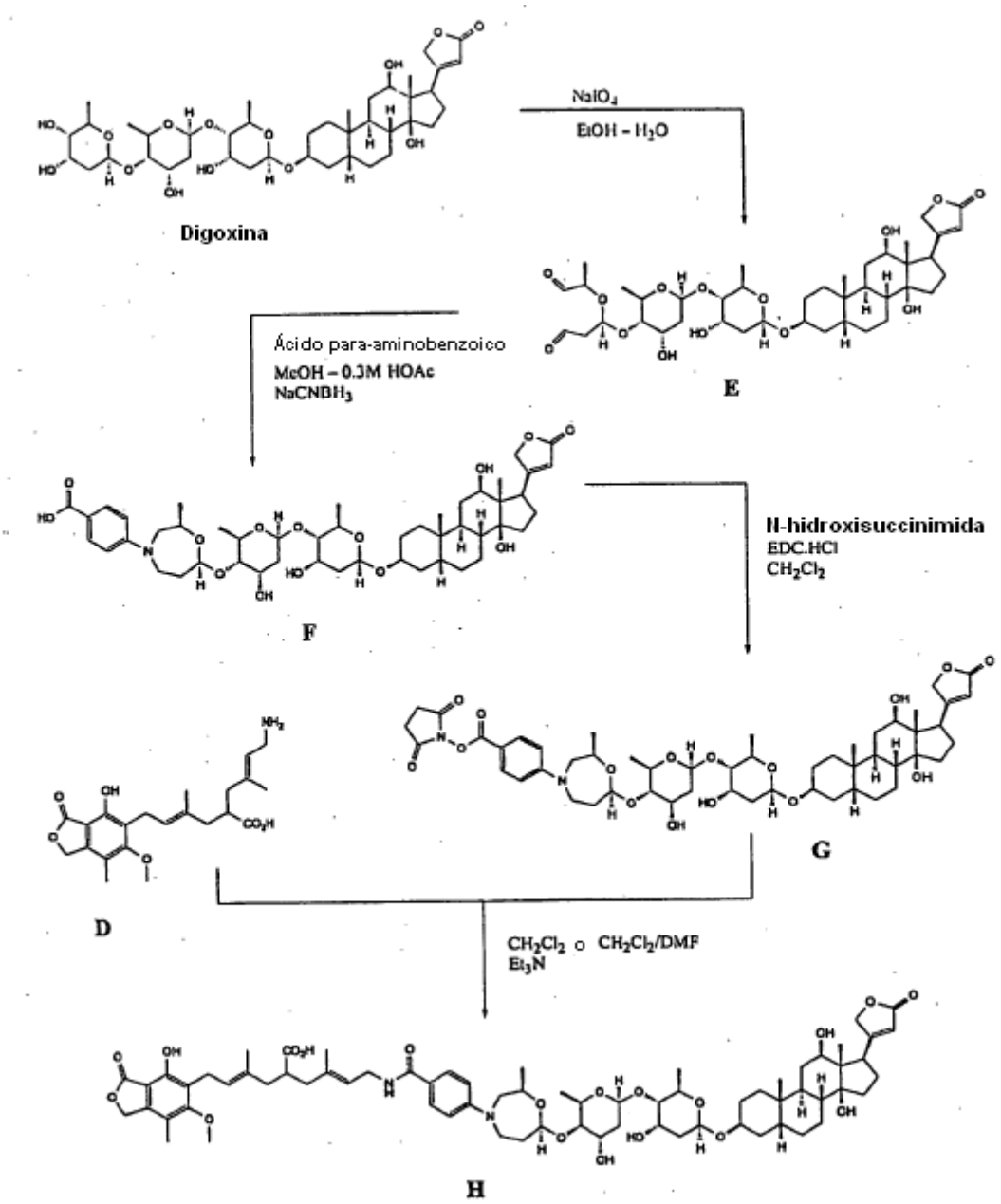

Digoxina
NaIO4
EtOH – H2O
E
Ácido para-aminobenzoico
MeOH – 0.3M HOAc
NaCNBH3
F
N-hidroxisuccinimida
EDC.HCl
CH2Cl2
G
D
CH2Cl2 o CH2Cl2/DMF
Et3N
H

Figura 21

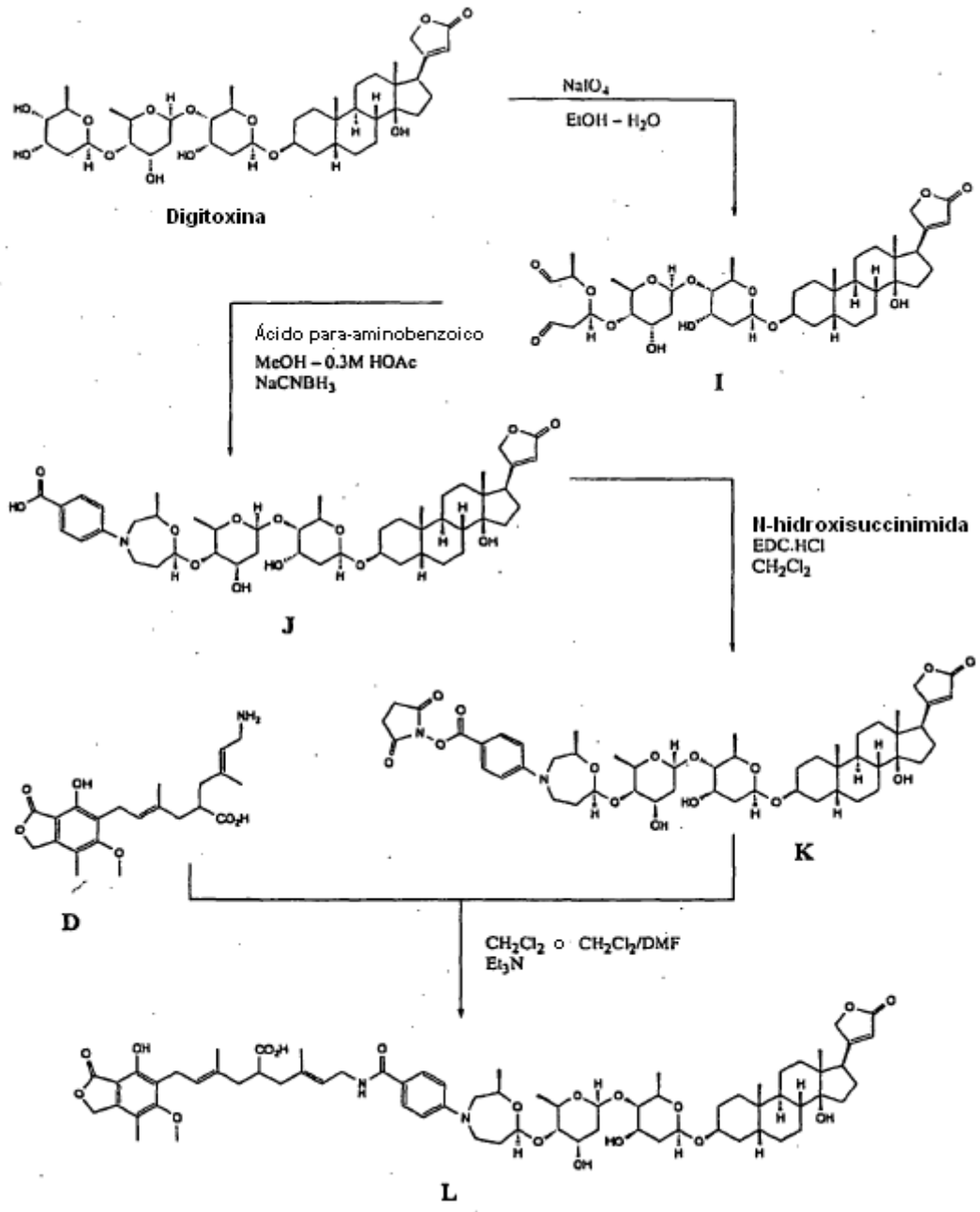

Digitoxina
NaIO4
EtOH – H2O
I
Ácido para-aminobenzoico
MeOH – 0.3M HOAc
NaCNBH3
J
N-hidroxisuccinimida
EDC.HCl
CH2Cl2
K
D
CH2Cl2 o CH2Cl2/DMF
Et3N
L

Figura 22

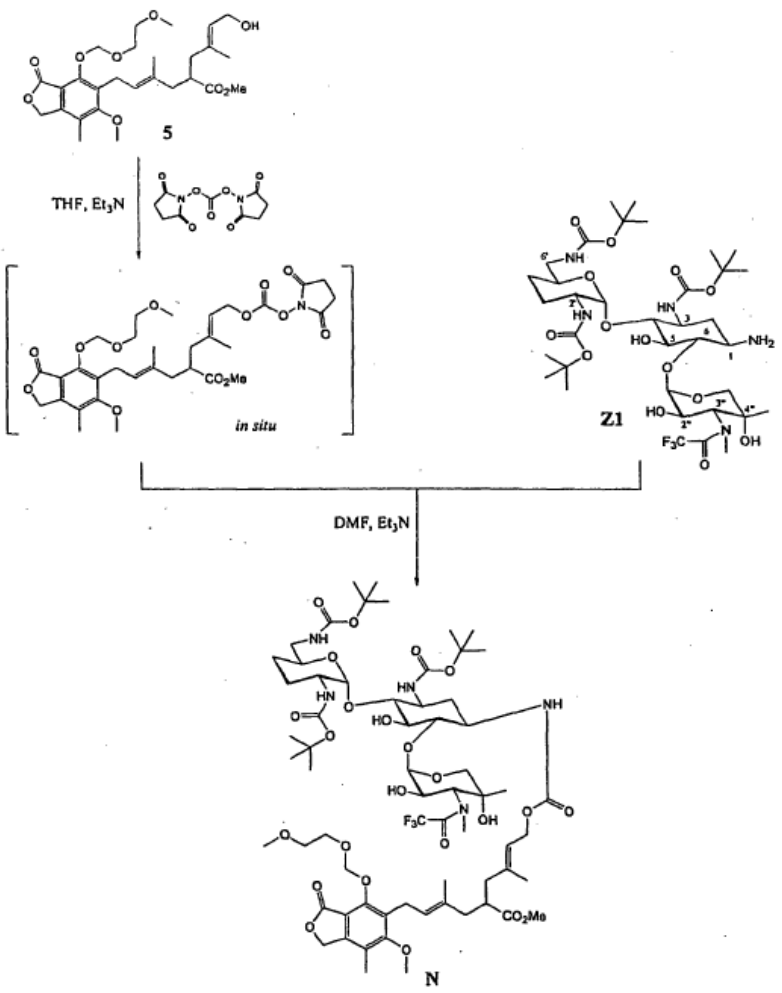


Figura 23a

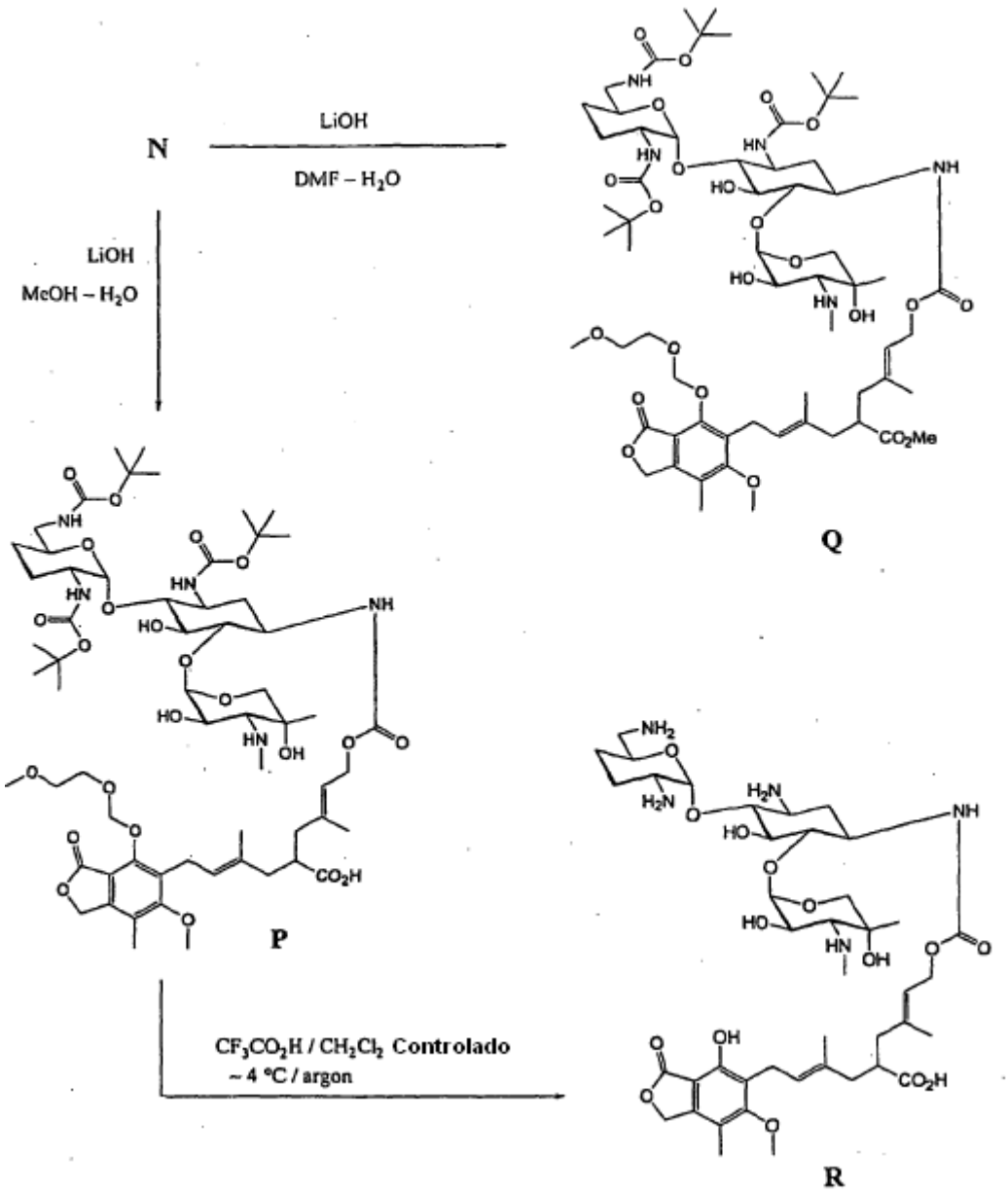

N
LiOH
DMF – H2O
LiOH
MeOH – H2O
Q
P
CF3CO2H / CH2Cl2 Controlado
~ 4 °C / argon
R

Figura 23b

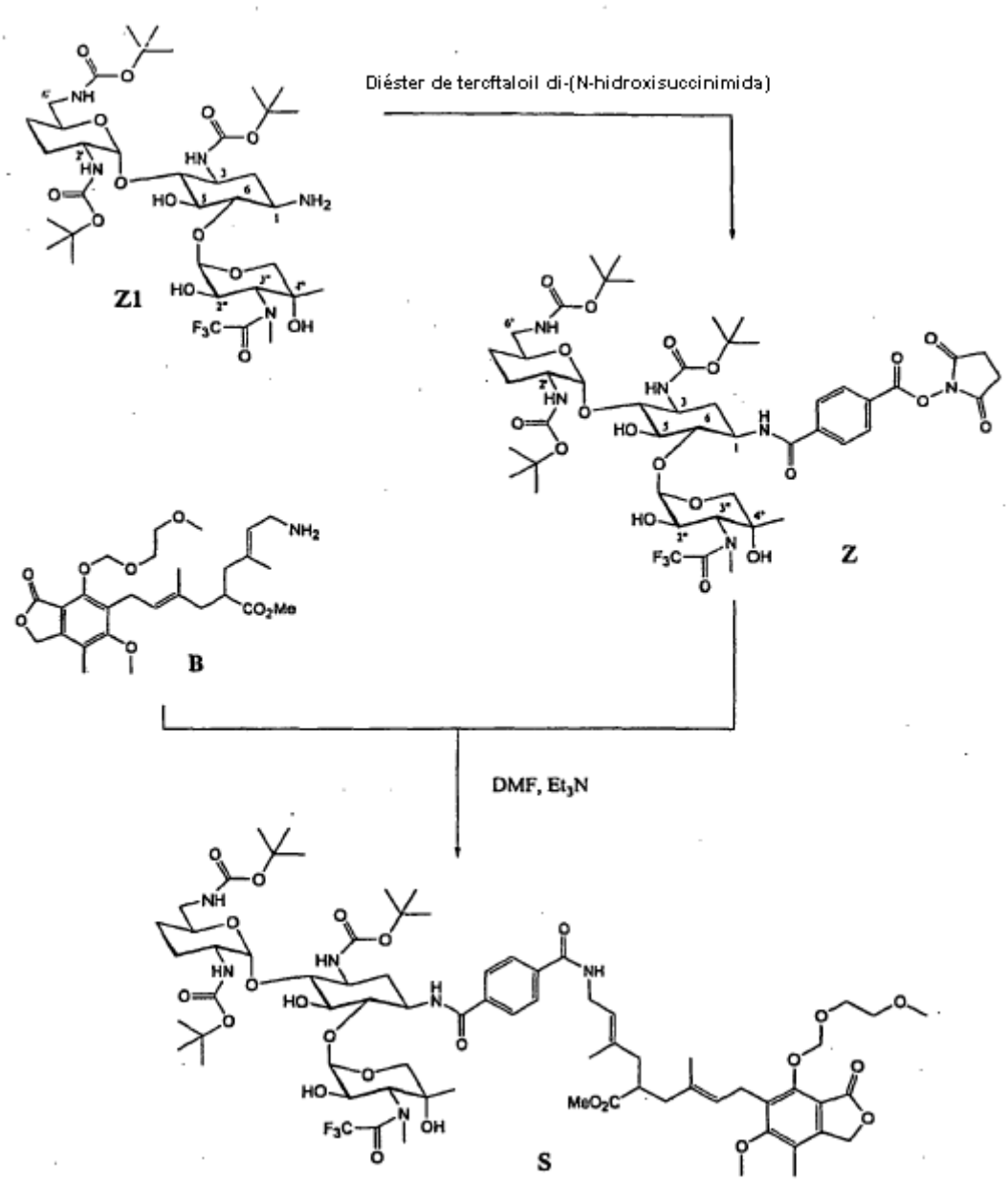
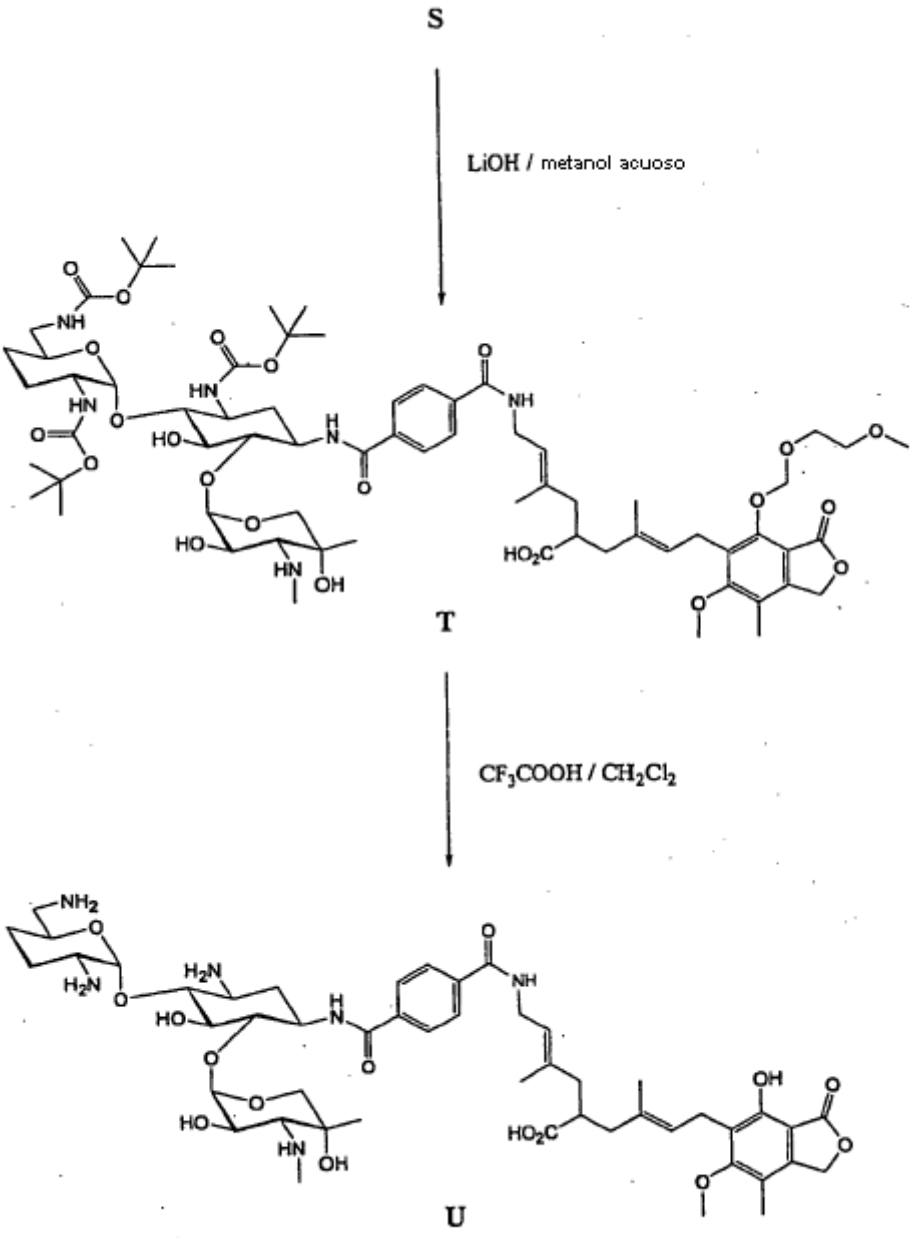

Diéster de tereftaloil di-(N-hidroxisuccinimida)
Z1
Z
B
S
DMF, Et3N

Figura 24a



Conjugado de MPA-Gentamicina (enlace amida)

Figura 24b

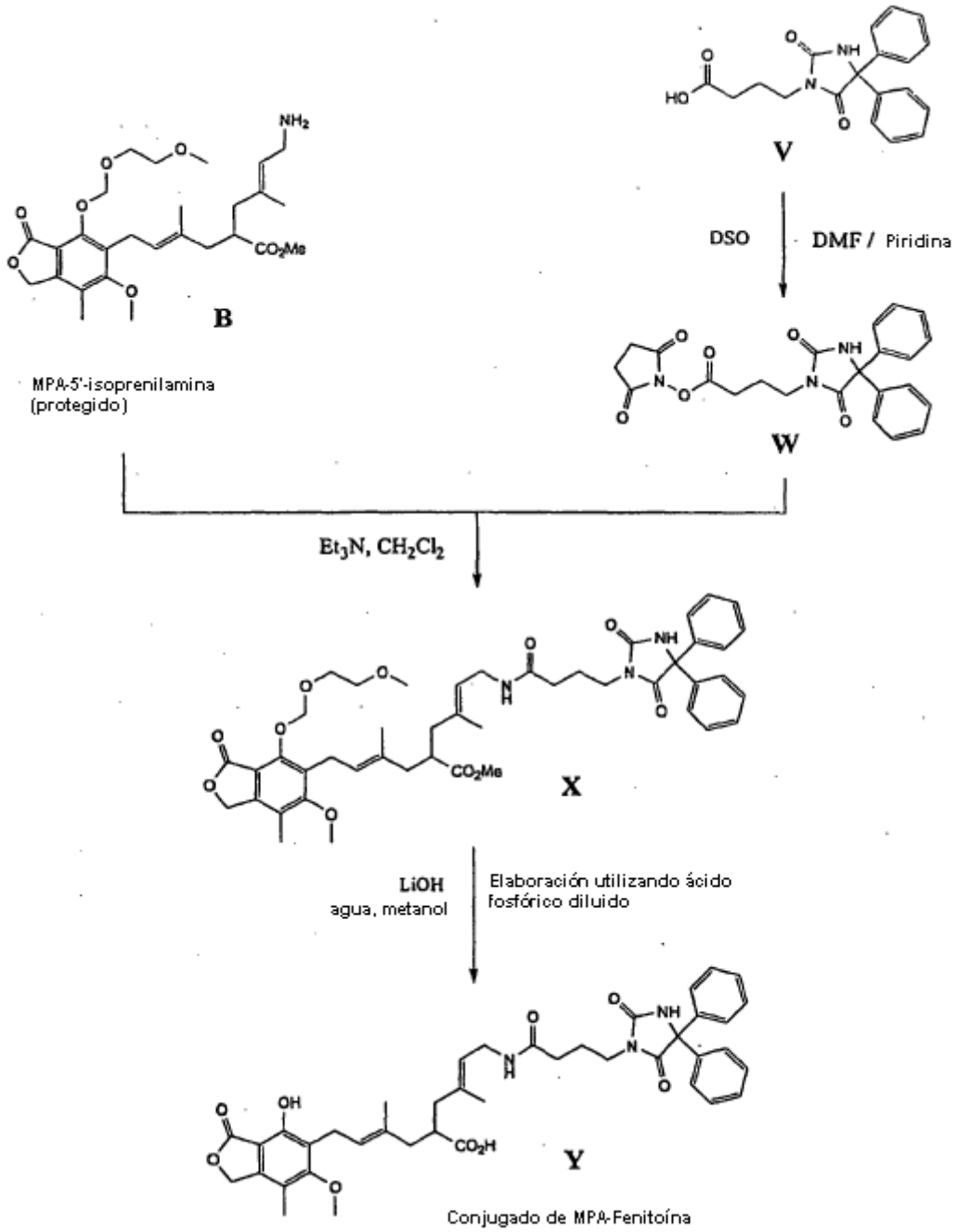

V
DSO
DMF / Piridina
B
MPA-5'-isoprenilamina
(protegido)
W
Et3N, CH2Cl2
X
LiOH
agua, metanol
Elaboración utilizando ácido
fosfórico diluido
Y
Conjugado de MPA-Fenitoína

Figura 25

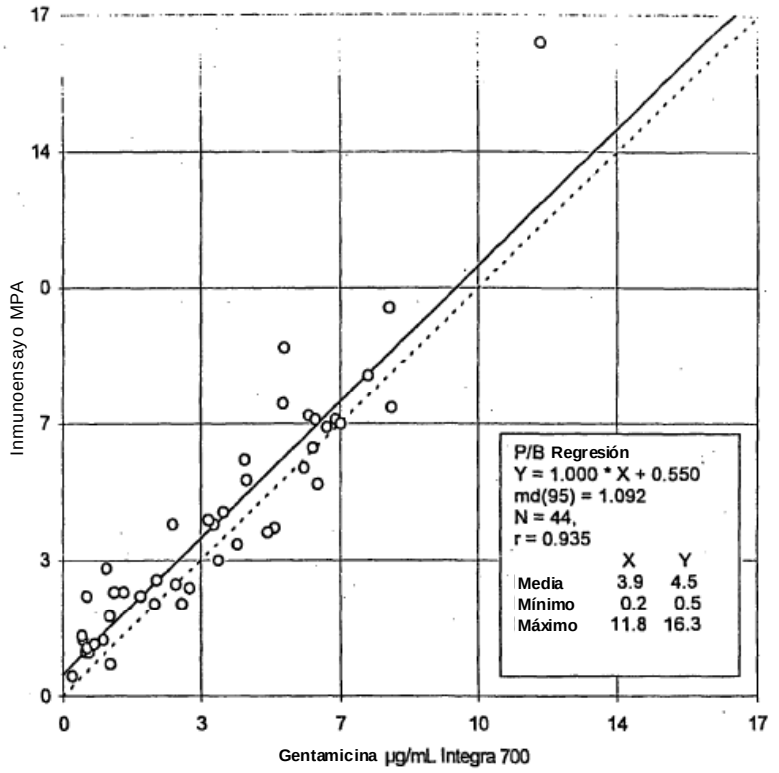

17
14
0
7
3
0
0
3
7
10
14
17
Inmunoensayo MPA
Gentamicina µg/mL Integra 700
P/B Regresión
Y = 1.000 * X + 0.550
md(95) = 1.092
N = 44,
r = 0.935
X Y
Media 3.9 4.5
Mínimo 0.2 0.5
Máximo 11.8 16.3

Figura 26

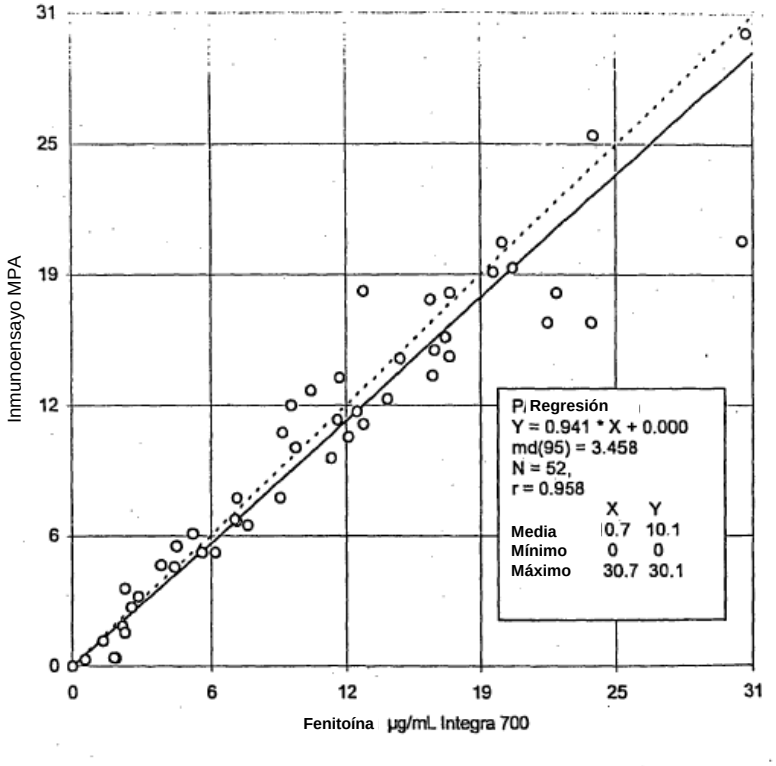

Inmunoensayo MPA
Fenitoína µg/mL Integra 700
0
6
12
19
25
31
Pᵢ Regresión
Y = 0.941 * X + 0.000
md(95) = 3.458
N = 52,
r = 0.958
X Y
Media 10.7 10.1
Mínimo 0 0
Máximo 30.7 30.1

Figura 27

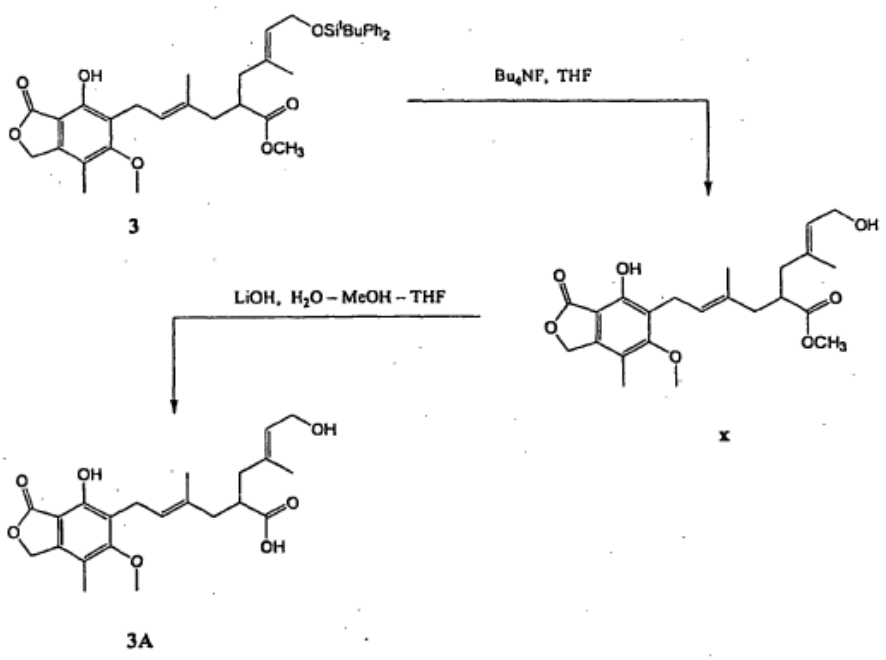

OSi^{t}BuPh$_2$
OH
O
O
O
OCH$_3$
3
Bu_4NF, THF
OH
OH
O
O
OCH$_3$
x
LiOH, H_2O – MeOH – THF
OH
OH
O
O
OH
3A

Figura 28

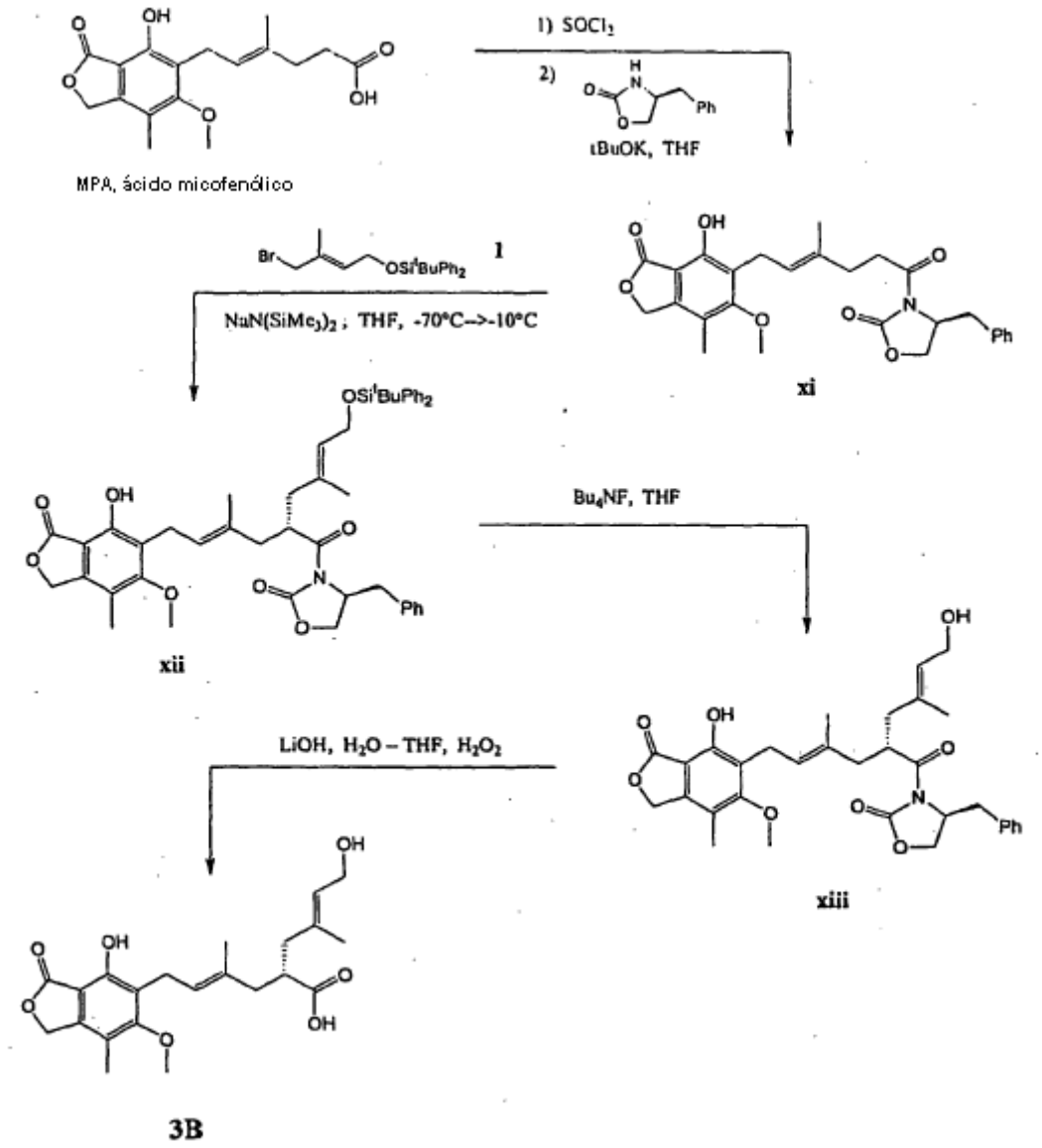

1) SOCl2
2)
tBuOK, THF
MPA, ácido micofenólico
Br
OSi'BuPh2
1
NaN(SiMe3)2, THF, -70°C-->-10°C
xi
OSi'BuPh2
xii
Bu4NF, THF
xiii
LiOH, H2O – THF, H2O2
3B

Figura 29