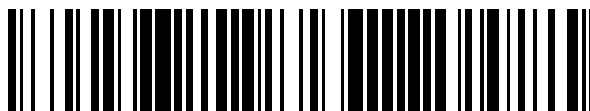


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 717**

51 Int. Cl.:
G01N 33/532 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08020499 .3**
96 Fecha de presentación: **26.11.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2065705**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

54 Título: **ESTABILIZACIÓN DE CONJUGADOS QUE COMPRENEN UNA MOLÉCULA CONECTORA DE TIUREA.**

30 Prioridad:
30.11.2007 EP 07023206

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**Blind, Rene;
Fink, Gerhard;
Hoess, Eva y
Kytzia, Hans-Joachim**

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).

ES 2 369 717 T3

DESCRIPCIÓN

Estabilización de conjugados que comprenden una molécula conectora de tiourea

Antecedentes de la invención

La presente invención da a conocer una composición que contiene un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea y tiourea o un derivado de la misma en forma libre. Asimismo, se refiere a un método para estabilizar un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, comprendiendo el método las etapas de proporcionar el conjugado, añadir al mismo tiourea o un derivado de la misma en forma libre, y estabilizar de esta manera el conjugado, y a la utilización de una composición que contiene un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea y tiourea o un derivado de la misma en forma libre.

El químico dispone de una gran diversidad de moléculas conectoras homobifuncionales y heterobifuncionales para unir covalentemente entre sí dos grupos de interés mediante dicha molécula conectora. La tiourea es una molécula conectora corta homobifuncional.

Puede intentarse la utilización de la tiourea como molécula conectora tras evaluar las moléculas conectoras homobifuncionales para su aplicabilidad a la unión de dos grupos entre sí con el fin de obtener un conjugado de estos dos grupos unidos entre sí covalentemente mediante la molécula conectora de tiourea.

En algunos casos la utilización de la tiourea comporta efectos deseados y ventajosos adicionales. Dichas propiedades ventajosas de una molécula conectora de tiourea han sido descritas en, por ejemplo, la patente US nº 6.586.460. Una molécula conectora de tiourea también puede suponer, por ejemplo, que ésta mantenga la distancia correcta entre dos grupos de interés. En otros casos determinados, los grupos reactivos presentes en los grupos que deben unirse entre sí justifican la utilización de tiourea. Alternativamente, puede ocurrir que se sintetice un primer producto intermediario que comprenda uno de los grupos de interés y tiourea ya unida al mismo, permitiendo de esta manera el acoplamiento a un segundo grupo de interés a través del grupo amino libre de tiourea todavía disponible para dicho acoplamiento.

Samuel Achilefu *et al.* (J. Med. Chem. 45:2003-2015, 2002) informan de un conjugado entre la fluoresceína y un péptido carbocianina que comprende tiourea como molécula conectora.

La patente WO nº 2006/032441 describe, por ejemplo, conjugados entre el isotiocianato de fluoresceína y la celobiosa o manosa, respectivamente.

Con frecuencia, una molécula conectora de tiourea simplemente representará la molécula conectora homobifuncional de elección más conveniente.

Una molécula conectora de tiourea, en el caso de que un conjugado que comprenda dicha molécula conectora se almacene con cuidado, habitualmente será bastante estable. Sin embargo, en los casos en que no puedan controlarse extensivamente las condiciones de almacenamiento, por ejemplo durante el transporte en una cadena de transporte no refrigerada, un conjugado que comprenda una molécula conectora de tiourea podría deteriorarse.

También pueden ponerse de manifiesto efectos negativos de estrés térmico, que requieran medidas compensatorias bajo condiciones de estrés durante el transporte. En el caso de que, por ejemplo, se utilice a modo de material denominado trazador en un inmunoensayo un conjugado que comprende dos grupos, por ejemplo un analito y un marcaje unido covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, dicho reactivo debería ser estable durante el máximo tiempo posible, tanto durante el transporte como también cargado en un analizador.

Evidentemente resultaría bastante ventajoso evitar el deterioro de un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea y se protegiera o estabilizara de esta manera el conjugado. Mediante dicha estabilización se reduciría el deterioro del conjugado. Esto podría conducir, por ejemplo, a una estabilidad mejorada durante el envío de dicho conjugado o bajo condiciones de almacenamiento de largo plazo.

Ahora se ha encontrado y se ha establecido que la tiourea en forma libre o un derivado apropiado de la misma, en caso de que se añade a un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, resulta muy efectiva en la reducción del deterioro de dicho conjugado.

Las composiciones y métodos descritos en la presente invención aparentemente resultan apropiados para mejorar la estabilidad de un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, tanto bajo condiciones de transporte como cargado en un analizador.

Descripción resumida de la invención

La presente invención da a conocer una composición que contiene un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea y tiourea o un derivado de la misma en forma libre.

5 Se describe un método para estabilizar un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, comprendiendo el método las etapas de proporcionar el conjugado, añadir al mismo tiourea o un derivado de la misma en forma libre y estabilizar de esta manera el conjugado.

10 También se da a conocer la amplia aplicabilidad y utilización de la tiourea o de un derivado apropiado de la misma como estabilizador de un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea.

Descripción detallada de la invención

15 En una primera realización, la presente invención se refiere a una composición que contiene un conjugado purificado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea y tiourea o un derivado de la misma según se define en las reivindicaciones en forma libre.

20 Tal como se ha indicado anteriormente, los inventores de la presente invención han encontrado que la tiourea en forma libre puede estabilizar un conjugado que comprende un enlace tiourea, siendo esto especialmente cierto en el caso de que el conjugado que requiere estabilización ha sido almacenado en forma líquida. Tal como apreciará el experto en la materia, dicho efecto estabilizador no requiere necesariamente la utilización de tiourea libre, debido a que también pueden utilizarse derivados de tiourea que muestran propiedades químicas similares con respecto a la

25 estabilización. El experto en la materia podrá seleccionar fácilmente los derivados de tiourea apropiados. Son ejemplos apropiados, aunque no limitativos, de derivados de tiourea, ditiobiurea, N-acetiltiourea, 2-imidazoliniona, N,N'-dimetiltiourea, 1-metil-2-tiourea y 1,1,3,3-tetrametil-2-tiourea. Preferentemente el derivado de tiourea se encontrará en la forma alquilada de tiourea, en la que uno, dos, tres o la totalidad de los cuatro átomos de hidrógeno de la tiourea se sustituyen con alquilo inferior, es decir, con un alquilo de seis o menos átomos de carbono.

30 Preferentemente dicho alquilo será metilo y/o etilo. Otros sustituyentes preferentes en uno o ambos nitrógenos de la tiourea comprenden acetilo, alqueno C1-C6 y tiourea. En un derivado de tiourea preferente adicional, se encuentra presente un puente alquilo o alqueno entre los dos átomos de nitrógeno, presentando dos o tres átomos de C. Tal como apreciará el experto en la materia, también resulta posible utilizar una mezcla de tiourea libre y un derivado de tiourea, o utilizar una mezcla de diferentes derivados de tiourea con el fin de estabilizar un conjugado que

35 comprenda una molécula conectora de tiourea.

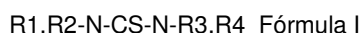
El término "purificado" se refiere al nivel del conjugado deseado en comparación con el nivel de los intermediarios de reacción y de los productos secundarios de reacción. Un conjugado purificado es una preparación de dicho conjugado que consiste de por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos 99% del

40 conjugado de interés. Los niveles de pureza preferentes son por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 98%, respectivamente.

Los grupos unidos covalentemente mediante un puente tiourea pueden ser cualquier grupo de interés en la química orgánica o en la bioquímica. Preferentemente, por lo menos un grupo presentará un peso molecular de 100 daltons

45 o más, o también preferentemente 150 ó 200 daltons o más. También preferentemente, ambos grupos presentarán un peso molecular de 100 daltons o más, o también preferentemente 150 ó 200 daltons o más. Preferentemente, por lo menos uno de los grupos grupos unidos mediante una molécula conectora de tiourea presentará un peso molecular de 20.000 daltons o inferior, también preferentemente de 10.000 daltons o inferior, o de 5.000 daltons o inferior.

50 Preferentemente, el conjugado comprendido en una composición según la presente invención presenta la fórmula I.



55 en la que R1 representa un primer grupo que es capaz de unirse a una pareja de unión, en la que R2 y R3 representan independientemente H, alquilo C1-C6, alqueno C1-C6 o acetilo, o en la que R2 y R3 forman un puente alquilo o alqueno C2 o C3 entre los dos átomos de nitrógeno, y en la que R4 representa un marcaje.

60 Preferentemente la composición de la presente invención comprende por lo menos un primer grupo que es capaz de unirse a una pareja de unión.

Preferentemente la pareja de unión es un miembro de una pareja de unión específica. Son parejas de unión bien conocidas y adecuadas en biología, bioquímica o inmunoquímica, un hapteno o un antígeno capaz de unirse a un anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina capaces de unirse a

avidina o a estreptavidina, azúcar, capaz de unirse a lectina, un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico capaces de unirse a un ácido nucleico complementario, un receptor capaz de unirse a un ligando, por ejemplo un receptor de hormona esteroidea capaz de unirse a una hormona esteroidea. Estas parejas de unión también pueden denominarse parejas de unión bioafines. Son miembros preferentes de una pareja de unión, un hapteno de un antígeno y un anticuerpo que se une a este hapteno o a este antígeno, respectivamente. También resulta preferente una pareja de unión peptídica que puede obtenerse, por ejemplo, mediante expresión fágica (ver, por ejemplo, Allen *et al.*, TIBS 20:511-516, 1995).

En una realización preferente, la pareja de unión a la que es capaz de unirse el primer grupo o grupos es un anticuerpo, y el primer grupo representa un analito o un derivado de analito.

Una pareja de unión presenta una afinidad de por lo menos 10^7 l/mol para su molécula diana correspondiente, es decir, el segundo componente de una pareja de unión. La pareja de unión preferentemente presenta una afinidad de 10^8 l/mol, o todavía más preferentemente de 10^9 l/mol para su molécula diana.

También preferentemente, la pareja de unión se une específicamente a la molécula diana de interés. Tal como apreciará el experto en la materia, el término "específico" frecuentemente se utiliza para indicar adicionalmente que algunas moléculas biológicas aparte de la molécula diana presentes en una muestra no se unen significativamente al agente específico de unión. Preferentemente, el nivel de unión a una molécula biológica aparte de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es sólo 10% o inferior, más preferentemente sólo 5% o inferior, a la afinidad de la molécula diana. Una pareja de unión específica más preferente satisfará los criterios de mínimos anteriormente indicados para afinidad y especificidad.

Preferentemente, el primer grupo o grupos que forman parte de un conjugado que debe estabilizarse mediante un método o en una composición según la presente invención, es un analito de bajo peso molecular o un derivado inmunológicamente equivalente del mismo.

Preferentemente, dicho analito de bajo peso molecular presenta un peso molecular de 2.000 daltons o menos. La expresión "derivado inmunológicamente equivalente" se utiliza para indicar que el primer grupo o grupos no son necesariamente idénticos al analito de bajo peso molecular de interés. Por el contrario resulta suficiente con frecuencia utilizar una estructura o derivado estrechamente relacionado de dicho analito para formar el conjugado tal como se ha comentado anteriormente. Un analito derivado es suficiente como equivalente o sustituto del analito diana con la condición de que se una del mismo modo a la pareja de unión utilizada en la detección de dicho analito de interés. Preferentemente, el primer grupo es capaz de unirse a un anticuerpo.

Son analitos de bajo peso molecular preferentes, los fármacos terapéuticos y los fármacos con potencial de abuso. El fármaco terapéutico preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de aminoglucósidos, tales como ampicilina, gentamicina y tobramicina, carbamacepina, lidocaína, procainamida, barbitúricos tales como fenobarbiturato y secobarbiturato, fenitoína, primidona, quinidina, tiroxina, T3, teofilina, ácido valproico, vancomicina y metabolitos o derivados fisiológicos de la totalidad de los mismos.

El fármaco con potencial de abuso preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de anfetamina, cocaína, metabolitos de la cocaína tales como la benzoilecgonina, la metanfetamina, opiáceos y derivados de opiáceos, cannabinoides tales como el tetrahidrocannabinol, y la fenciclidina. Un analito diana preferente adicional es el folato, especialmente el denominado folato total, tal como se encuentra en el plasma sanguíneo y en los glóbulos rojos.

Los analitos diana preferentes son los fármacos inmunosupresores. El fármaco inmunosupresor preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de ciclosporina (CsA), micofenolato mofetil (MMF), rapamicina (RAPA, también denominada sirolimus), tacrolimus (FK-506), azatioprina (AZA) y metilprednisolona (MP).

En una realización preferente adicional, el conjugado contenido en la composición de la presente invención comprende un marcaje. Un marcaje es una sustancia detectable directa o indirectamente, respectivamente.

El marcaje según la presente invención puede ser un marcaje detectable directamente o un marcaje detectable indirectamente. Ambos tipos de marcaje son bien conocidos por el experto en la materia y éste seleccionará el marcaje apropiado según sus necesidades.

Son marcajes bien conocidos y preferentes que son directamente detectables, los grupos luminiscentes, por ejemplo grupos quimioluminiscentes como los ésteres de acridinio o los dioxetanos, o los pigmentos fluorescentes, por ejemplo la fluoresceína, la coumarina, la rodamina, la oxazina, la resorufina, la cianina y los derivados de los mismos. Otros ejemplos preferentes de grupos de marcaje directamente detectables son complejos metálicos luminiscentes tales como complejos metálicos luminiscentes tales como complejos de rutenio o europio; enzimas, por ejemplo enzimas utilizados en métodos ELISA o partes de enzimas, tales como los utilizados en CEDIA

(inmunoensayo de donante para enzima clonado, por ejemplo en la patente EP nº A-0 061 888) y los isótopos radioactivos. Los marcajes detectables indirectamente son grupos que son capaces de unirse a una pareja de unión específica que porta un marcaje directamente detectable, tal como se describe en el párrafo anterior.

5 Los marcajes detectables indirectamente preferentes son parejas de unión de bajo peso molecular de parejas de unión de alta afinidad tales como haptenos capaces de unirse a un anticuerpo, biotina capaz de unirse a avidina o estreptavidina, o ácidos nucleicos capaces de unirse a ácidos nucleicos complementarios. Los haptenos son moléculas pequeñas con un peso molecular inferior a 2 kDa, preferentemente inferior a 1,5 kDa y más preferentemente inferior a 1 kDa. Un hapteno no es inmunogénico por sí mismo. Sin embargo, al conjugarse con una
10 molécula portadora apropiada, puede utilizarse dicho conjugado para convertir al hapteno en inmunogénico y generar de esta manera una respuesta inmunológica apropiada. Los anticuerpos policlonales, así como los monoclonales, contra haptenos de diversos tipos son bien conocidos de la técnica. Son haptenos bien conocidos y preferentes, por ejemplo, la biotina, el dinitrofenilfosfato, las hormonas esteroideas, muchos fármacos de bajo peso molecular, la digoxina y la digoxigenina.

15 Con el fin de conseguir una estabilización razonable de un conjugado que comprende una molécula conectora de tiourea, el experto en la materia determinará qué proporción molecular de conjugado a tiourea libre es más adecuada para conseguir el efecto deseado. En una realización preferente, la composición según la presente invención contiene tiourea o un derivado de la misma en forma libre en una concentración por lo menos equimolar
20 con la molécula conectora de tiourea comprendida en el conjugado. En una realización preferente, la composición según la presente invención contiene tiourea o un derivado de la misma en forma libre en una concentración por lo menos equimolar a la molécula conectora de tiourea comprendida en el conjugado.

25 Preferentemente, la composición de la presente invención comprende tiourea o un derivado de la misma en un exceso molar de aproximadamente 1.000 veces respecto a la concentración del conjugado que contiene tiourea que requiere estabilización/protección.

Las concentraciones elevadas de tiourea o de un derivado de la misma aparentemente no presentan un efecto negativo sobre el conjugado que debe estabilizarse. El experto en la materia podrá seleccionar fácilmente la
30 concentración más alta de tiourea o de un derivado de la misma para su uso pretendido. Preferentemente, la composición de la presente invención comprende tiourea o un derivado de la misma en un exceso molar de aproximadamente 10^5 veces o menos respecto a la concentración del conjugado que contiene tiourea que requiere estabilización/protección. También preferentemente el exceso molar será 10^4 veces o menos ó 5.000 veces o menos en comparación con la concentración del conjugado que contiene tiourea que requiere estabilización/protección.

35 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para estabilizar un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, comprendiendo el método: proporcionar el conjugado, añadir al mismo tiourea o un derivado de la misma según las reivindicaciones en forma libre y estabilizar de esta manera el conjugado.

40 Habitualmente el conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea se sintetiza químicamente y el conjugado deseado se purifica por medios apropiados, tales como la cromatografía. El conjugado habitualmente puede almacenarse bajo condiciones de almacenamiento apropiadas, preferentemente congelado hasta que se necesite para formular una composición líquida que comprende el
45 conjugado. El líquido, preferentemente un tampón, que recibe el conjugado, podría ya contener la tiourea libre o un derivado de la misma, o dichos estabilizadores pueden añadirse al líquido simultáneamente o después de la adición del conjugado.

50 Tal como apreciará el experto en la materia, el método de estabilización de un conjugado que comprende una molécula conectora de tiourea que une covalentemente dos grupos puede ponerse en práctica con cualquiera de los conjugados y grupos preferentes, respectivamente, tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Preferentemente, el método se pone en práctica con un conjugado que comprende una molécula conectora de tiourea que une covalentemente dos grupos y que presenta por lo menos un primer grupo que es capaz de unirse a
55 una pareja de unión.

También resulta preferente que el método se aplique para estabilizar un conjugado que comprende una molécula conectora de tiourea que une covalentemente dos grupos y que presenta por lo menos un segundo grupo que es un
60 grupo de marcaje.

También resulta preferente que el método se aplique a la estabilización de un conjugado que comprende una molécula conectora de tiourea que une covalentemente dos grupos y que presenta por lo menos un primer grupo que es capaz de unirse a una pareja de unión y por lo menos un segundo grupo que es un grupo de marcaje.

Preferentemente, el método para estabilizar el conjugado que comprende una molécula conectora de tiourea que une covalentemente dos grupos se pone en práctica mediante la adición de tiourea en forma libre o de un derivado de tiourea en forma libre hasta una concentración final que es por lo menos una concentración equimolar y, como máximo, un exceso molar de 10^5 veces respecto a la molécula conectora de tiourea comprendida en el conjugado.

Una realización preferente adicional se refiere a la utilización de tiourea o de un derivado de la misma según las reivindicaciones como estabilizador para un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea.

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1 Estructura de un conjugado de carbamazepina-fluoresceína. El conjugado ilustrado comprende un grupo que es capaz de unirse a una pareja de unión (la carbamazepina que puede unirse a un anticuerpo de la misma) y un marcaje (fluoresceína) que se unen entre sí mediante tiourea.

Figura 2 Estabilidad frente al estrés del trazador carbamazepina. Se ilustra la estabilizador del trazador a 45°C para preparaciones de trazador sin aditivo (sin aditivo) o para preparaciones que comprenden ácido ascórbico (AA), tiourea (THU), sulfito sódico (Na_2SO_3) (sulfito) y 1,4-ditiotreitol (DTE), respectivamente. Los puntos temporales mostrados son 0, 1, 2, 3 y 4 semanas, respectivamente.

Figura 3 Efecto sobre la estabilidad/inestabilidad de un conjugado de trazador integrado sobre las lecturas de muestras de control. Se midieron muestras de control que comprendían tres niveles diferentes de carbamazepina con una preparación de trazador que se dejó en el analizador durante un máximo de 12 semanas. Las concentraciones calculadas de estos controles se proporcionan dependiendo del tiempo de almacenamiento integrado. Los valores altos se traducen en un deterioro del trazador. Se muestran los datos para dos preparaciones de conjugado de trazador (ver la fig.1) sin (figura 3A) y con tiourea (figura 3B) a modo de estabilizador, respectivamente.

Ejemplo 1

Efecto de diversos antioxidantes sobre la estabilidad de un conjugado que contiene tiourea

El conjugado ilustrado en la fig. 1, que comprende carbamazepina como grupo que es capaz de unirse a una pareja de unión, fluoresceína a modo de marcaje y una molécula conectora de tiourea, se utiliza como conjugado modelo para demostrar tanto los problemas de estabilidad que pueden aparecer, así como la manera de estabilizar dicho conjugado.

Se investigó la estabilidad del conjugado de carbamazepina-fluoresceína en tampón que contenía diferentes antioxidantes. Se evaluaron diversos antioxidantes para su efecto sobre la estabilización del conjugado utilizados en el reactivo trazador. Se añadieron ácido ascórbico (AA), tiourea (THU), sulfito sódico (Na_2SO_3) y 1,4-ditiotreitol (DTE) al reactivo trazador del ensayo de carbamazepina a una concentración final de 20 mmol/l. Se mezclaron 320 μl de tampón Tris 50 mM a pH 7,5 con o sin antioxidantes a 20 mM, con 40 μl de DMF, y 40 μg de conjugado disueltos en dichos 40 μl de DMF.

Se almacenaron a 4°C alícuotas de cada uno de las mezclas de reactivos resultantes, mientras que otras alícuotas se sometieron a estrés térmico mediante almacenamiento a 45°C. Estas alícuotas se compararon entre sí, así como con una preparación de trazador que no contenía antioxidante. Se analizó la estabilidad del trazador tras una, dos, tres y cuatro semanas, respectivamente.

Se analizaron las muestras mediante HPLC utilizando una columna de fase inversa (Zorbax C3) y un gradiente ácido de agua/acetonitrilo a 60°C cada semana. Se calculó la estabilidad del conjugado a partir de los picos obtenidos en el análisis de HPLC.

Resulta evidente a partir de la figura 2 que el efecto estabilizador sobre el conjugado de carbamazepina-fluoresceína, es decir, un conjugado entre dos grupos que comprende una molécula conectora de tiourea, aparentemente no se debe a un mero efecto antioxidante, debido a que únicamente la tiourea proporciona estabilización a 45°C, mientras que antioxidantes como el ácido ascórbico o el ditiotreitol presentaron incluso un impacto negativo sobre la estabilidad del conjugado.

Ejemplo 2**Compatibilidad de la tiourea con reactivos inmunológicos**

- 5 La carbamazepina puede medirse, por ejemplo, con el kit de ensayo de carbamazepina disponible comercialmente de Roche Diagnostics (nº de pedido 20737828). En este ensayo, se utiliza un conjugado de carbamazepina-fluoresceína como reactivo trazador.

- 10 Brevemente, el ensayo de carbamazepina disponible comercialmente de Roche funciona del modo siguiente. Se establece una curva estándar o de calibración haciendo reaccionar diferentes cantidades de carbamazepina con el conjugado de la fig. 1 y con un anticuerpo contra la carbamazepina; de modo similar, se mezcla una alícuota de la muestra que debe analizarse con un reactivo que comprende el conjugado de carbamazepina-fluoresceína y un reactivo que comprende un anticuerpo contra carbamazepina. La carbamazepina en la muestra (o estándar) y el conjugado compiten para la unión con el anticuerpo. El complejo de anticuerpo-carbamazepina-fluoresceína se detecta específicamente. Cuanto más carbamazepina haya en una muestra, menor será la señal generada para esa muestra. Se lee la señal de la muestra en la curva de calibración y se traduce seguidamente en concentración de carbamazepina en la muestra. Los detalles procedimentales completos del ensayo disponible comercialmente pueden obtenerse del impreso en el paquete para el nº de cat. 20737828 de Roche Diagnostics y no es necesario reproducirlos en la presente memoria. En el caso de que se planteen preguntas relativas a los detalles de las mediciones, se hace referencia específica al impreso contenido en el paquete.

- 25 Se utilizó el trazador que comprendía el conjugado de carbamazepina-fluoresceína, es decir un conjugado en el que los grupos carbamazepina y fluoresceína se encontraban unidos por la tiourea. Para la evaluación de los efectos de la tiourea sobre los reactivos inmunológicos del ensayo comercial de carbamazepina, la medición se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó el reactivo trazador para este experimento con y sin tiourea (20 mM), respectivamente.

- 30 Tal como puede observarse en la Tabla 1, la adición de tiourea (THU) a una mezcla de reactivos trazadores preparada análogamente al trazador utilizado en el producto comercial, no interfería con la medición de la carbamazepina, debido a que se midieron señales comparables para un trazador con y sin tiourea.

Tabla 1:

Señal medida con y sin tiourea como estabilizador			
Estándar	Carbamazepina, en µl	tasa (unidades arbitrarias) sin THU	tasa (unidades arbitrarias) con THU
Std-F	20	125,91	126,54
Std-E	10	148,96	150,65
Std-D	5	180,09	181,52
Std-C	2,5	213,43	215,87
Std-B	1,25	240,25	242,35
Std-A	0	268,88	269,48

Ejemplo 3**Efecto de la tiourea sobre la estabilidad frente al estrés térmico de un conjugado unido con tiourea**

- 40 Las condiciones de almacenamiento de largo plazo a temperatura refrigerada, así como las condiciones de estrés térmico durante el transporte se evalúan frecuentemente mediante modelos de estrés térmico de corto plazo. Se preparó el reactivo trazador para este experimento con y sin tiourea (20 mM), respectivamente, y la medición se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la estabilidad de la solución que contenía el conjugado de carbamazepina-fluoresceína en presencia o en ausencia de tiourea libre (20 mM) tras el almacenamiento de tres semanas a 45°C y se comparó con una solución de trazador que no contenía estabilizador analizada el día cero.

- 45 Tal como puede observarse en la Tabla 2, la adición de tiourea a una mezcla de reactivos trazadores preparada análogamente al trazador utilizado en el producto comercial, estabiliza dicha mezcla de reactivos incluso en el caso de que se almacene bajo condiciones de estrés térmico, es decir, durante tres semanas a 45°C.

Efecto de la tiourea libre sobre la estabilidad del trazador bajo estrés térmico			
Tasa	día 0	3 semanas a 45°C	3 semanas a 45°C
Estándar	sin tiourea	sin tiourea	con tiourea
Std-F	127,42	119,78	125,74
Std-E	151,18	141,23	148,57
Std-D	180,14	168,25	178,86
Std-C	213,34	201,40	210,42
Std-B	242,59	227,37	238,27
Std-A	277,80	262,60	272,62

Tal como se ha indicado anteriormente, las soluciones de calibrador, es decir aquellas soluciones utilizadas para establecer una curva de calibración a partir de la que pueden leerse los valores de absorbancia y calcularse las concentraciones correspondientes, también contienen el conjugado de la fig. 1.

Ejemplo 4

Efecto de la concentración de tiourea sobre la estabilidad de un conjugado unido con tiourea

Se evaluaron tres concentraciones diferentes de tiourea, es decir 10 mM, 20 mM y 30 mM, respectivamente, para sus efectos estabilizadores sobre cuatro preparaciones diferentes de conjugados de carbamazepina-fluoresceína. Se llevó a cabo la medición tal como se ha indicado anteriormente. Se evaluó la estabilidad del conjugado de trazador mediante la lectura de las señales del calibrador más alto comprendido en el ensayo de carbamazepina disponible comercialmente tras el almacenamiento a 45°C durante dos semanas en comparación con la señal el día cero.

Resulta evidente a partir de la Tabla 3 que la totalidad de las tres concentraciones de tiourea sometidas a ensayo aparentemente estabilizaban un conjugado de carbamazepina-fluoresceína. Mientras que el grado de pérdida de señal sin estabilizador mostraba cierta variabilidad, el efecto estabilizador de la tiourea libre aparentemente eliminaba la inestabilidad independientemente de las propiedades básicas de estabilidad (es decir, sin adición de tiourea) de dicho conjugado de carbamazepina-fluoresceína.

Tabla 3:

Pérdida de señal del calibrador más alto				
Cal A [Δmp]	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
0 mmol/L	18,10	11,89	7,94	8,15
10 mmol/L	4,01	3,41	4,75	4,18
20 mmol/L	4,94	5,60	3,48	3,45
30 mmol/L	4,82	4,20	3,81	4,37

Ejemplo 5

Efecto de la estabilización del trazador mediada por tiourea sobre la recuperación de carbamazepina

Se utilizó un lote bastante inestable de un conjugado de carbamazepina-fluoresceína para preparar una solución de trazador con y sin tiourea como estabilizador y se investigó la estabilidad integrada de dicho reactivo durante un periodo de 16 semanas. Se evaluó indirectamente la estabilidad del trazador mediante una medición cuantitativa de tres muestras diferentes que contenían 3,33, 9,66 y 15,07 μ g/ml de carbamazepina, respectivamente.

Tal como puede apreciarse fácilmente a partir de una comparación de las figuras 3a y 3b, la adición de tiourea en

forma libre también estabiliza el conjugado de trazador dentro del analizador. La tiourea libre añadida a un conjugado que comprende una molécula conectora de tiourea aparentemente mejora la estabilidad del conjugado bajo diversas condiciones, tales como el estrés térmico de corto plazo o en el interior de un analizador automático.

5 Ejemplo 6

Evaluación de diversos derivados de la tiourea

Se añadieron diferentes derivados de tiourea al reactivo trazador de carbamazepina a una concentración final de 20 mmolar. Se midieron las señales de calibrador el día 0 y tras 15 días a 4°C y a 35°C, respectivamente. Todos los valores en las Tablas 4 y 5, respectivamente, se proporcionan en % del valor correspondiente para el día 0. En la columna denominada "referencia" se utilizó tiourea como estabilizador, mientras que en CARB1, se utilizó ditiobiurea, en CARB2, N-acetiltiourea, en CARB3, 2-imidazoliniona, en CARB4, N,N'-dimetil-tiourea, en CARB5, 1-metil-2-tioura, y en CARB6, 1,1,3,3-tetrametil-2-tiourea, respectivamente, como estabilizador.

Tabla 4:

Recuperación de las señales de calibrador tras el almacenamiento de 15 días a 4°C:							
Estándar	Referencia	CARB1	CARB2	CARB3	CARB4	CARB5	CARB6
Std-F	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Std-E	100%	100%	101%	100%	100%	101%	100%
Std-D	99%	100%	101%	100%	100%	101%	100%
Std-C	99%	100%	100%	100%	100%	101%	99%
Std-B	100%	100%	101%	100%	100%	101%	100%
Std-A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%

La recuperación fue buena con todos los derivados de tiourea utilizados.

Tabla 5:

Recuperación de las señales de calibrador tras el almacenamiento de 15 días a 35°C							
Estándar	Referencia	CARB1	CARB2	CARB3	CARB4	CARB5	CARB6
Std-F	97%	99%	101%	99%	100%	99%	99%
Std-E	98%	100%	101 %	99%	99%	99%	99%
Std-D	98%	100%	101%	99%	99%	100%	99%
Std-C	97%	100%	101%	99%	100%	99%	98%
Std-B	98%	99%	101%	99%	99%	99%	98%
Std-A	98%	99%	100%	99%	99%	99%	98%

Todos los derivados de tiourea mostrados en la Tabla 5 aparentemente presentaban un efecto estabilizador comparable al de la tiourea misma.

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene:
 - a) un conjugado purificado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, y b) tiourea o un derivado de la misma en forma libre, en la que dicho derivado de tiourea se selecciona de entre ditiobiurea, tiourea alquilada que presenta uno, dos, tres o la totalidad de los cuatro átomos de hidrógeno de la tiourea sustituidos con alquilo de seis o menos átomos de carbono, tiourea que presenta uno o ambos nitrógenos con acetilo o alquenilo C1-C6, y tiourea que presenta un puente alquilo o alquileo entre los dos átomos de nitrógeno de dos o tres átomos de C.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho conjugado comprende por lo menos un primer grupo que es capaz de unirse a una pareja de unión.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho grupo es capaz de unirse a un anticuerpo.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho conjugado comprende por lo menos un segundo grupo que es un grupo de marcaje.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la tiourea en forma libre se encuentra presente en por lo menos concentración equimolar a la de la molécula conectora de tiourea comprendida en el conjugado.
6. Método para estabilizar un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, comprendiendo el método:
 - a) proporcionar el conjugado, b) añadir al mismo tiourea o un derivado de la misma en forma libre, y c) estabilizar de esta manera el conjugado, en el que dicho derivado de tiourea se selecciona de entre ditiobiurea, tiourea alquilada que presenta uno, dos, tres o la totalidad de los cuatro átomos de hidrógeno de la tiourea sustituidos con alquilo de seis o menos átomos de carbono, tiourea que presenta uno o ambos nitrógenos con acetilo o alquenilo C1-C6, y tiourea que presenta un puente alquilo o alquileo entre los dos átomos de nitrógeno de dos o tres átomos de C.
7. Método según la reivindicación 6, en la que dicho conjugado comprende por lo menos un primer grupo que es capaz de unirse a una pareja de unión.
8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho conjugado comprende por lo menos un segundo grupo que es un grupo de marcaje.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que se añade la tiourea en forma libre, resultando en una concentración final que es por lo menos una concentración equimolar a la de la molécula conectora de tiourea comprendida en el conjugado.
10. Utilización de tiourea o de un derivado de la misma como estabilizador para un conjugado que comprende dos grupos unidos covalentemente mediante una molécula conectora de tiourea, en la que dicho derivado de tiourea se selecciona de entre ditiobiurea, tiourea alquilada que presenta uno, dos, tres o la totalidad de los cuatro átomos de hidrógeno de la tiourea sustituidos con alquilo de seis o menos átomos de carbono, tiourea que presenta uno o ambos nitrógenos con acetilo o alquenilo C1-C6, y tiourea que presenta un puente alquilo o alquileo entre los dos átomos de nitrógeno de dos o tres átomos de C.

Fig. 1

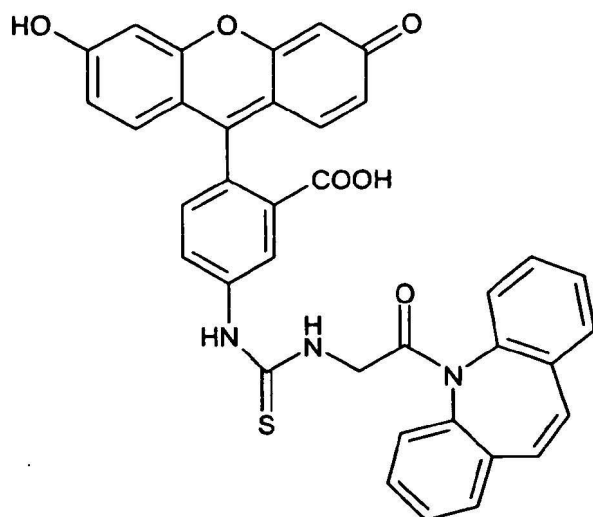


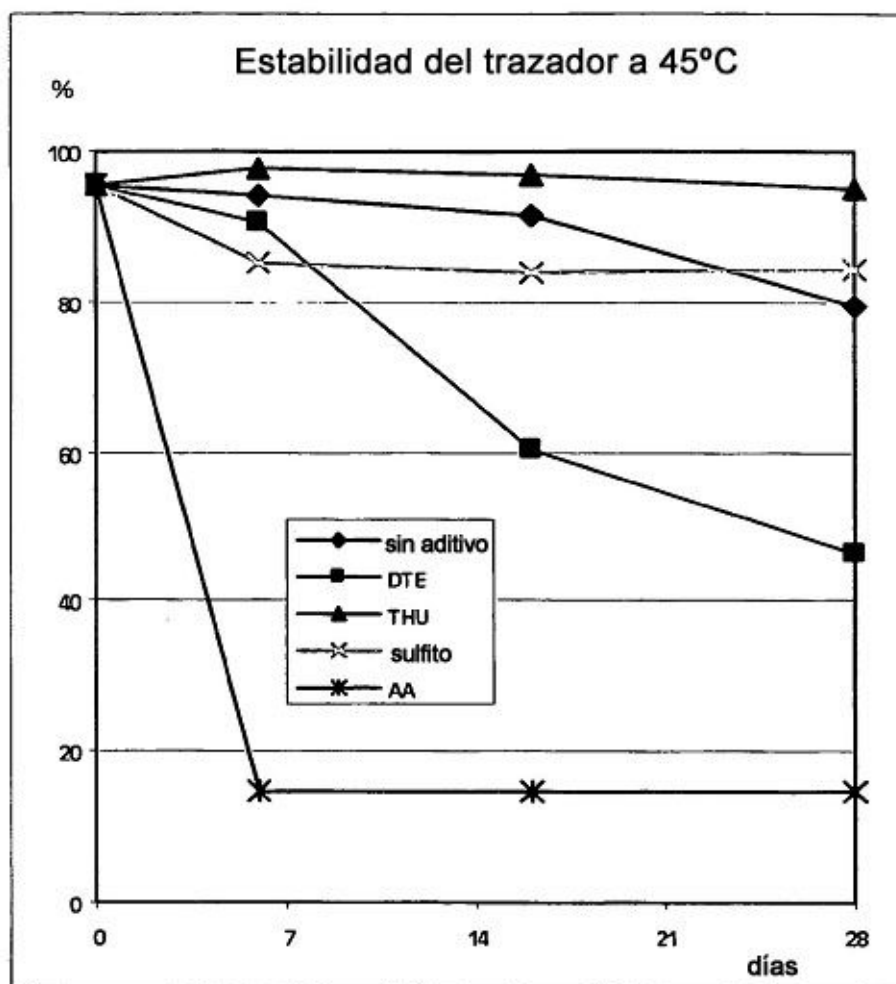
Fig. 2

Fig. 3A

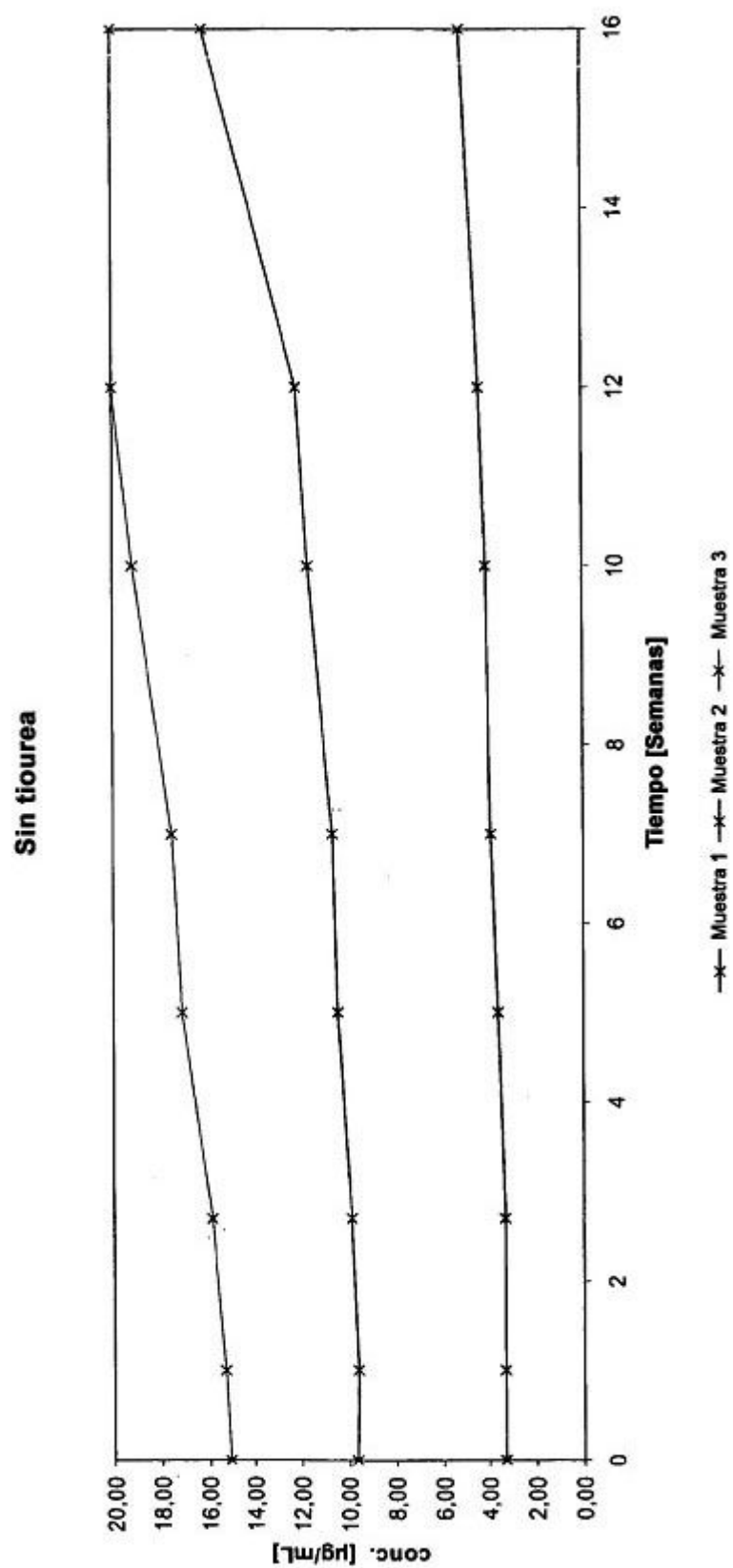


Fig. 3B

