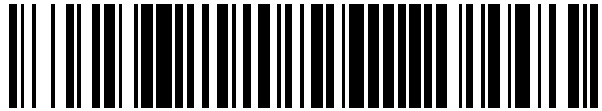


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 167**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2005 E 05725315 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1730525**

54 Título: **Inmunoensayos para everolimús**

30 Prioridad:

10.03.2004 US 551989 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.10.2013

73 Titular/es:

**SERADYN, INC. (100.0%)
81 Wyman Street
Waltham, Massachusetts 02451, US**

72 Inventor/es:

**ROBERTS, MARK;
ARABSHAH, LILI;
BOYD, JARED;
DENNIS, CHRISTOPHER, T.;
MARBACH, PETER;
AARON, GEORGE;
HWANG, DENG y
SHVETS, ALEXEI, BORIS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 425 167 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayos para everolímús

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere en general a reactivos y a procedimientos para la determinación de everolímús en fluidos biológicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 El everolímús [40-O-(2-hidroxietil)rapamicina] es un inmunosupresor macrólido novedoso. El everolímús (también conocido como SDZ-RAD, RAD o Certican[®]) se ha desarrollado por Novartis (Nashan B. "The role of Certican in the many pathways of chronic rejection". Transplantation Proceedings, 2001, 33: 3215-3230) en un esfuerzo por mejorar la rapamicina (sirolímús), un inhibidor de la señal de proliferación que bloquea las señales de transducción activadas por factor de crecimiento en las respuestas celulares ante aloantígeno (Cottens S, *et al.* "O-Alkylated rapamycin derivatives and their use, particularly as immunosuppressants", documento WO-009409010 28 de abril de 1994). El everolímús tiene una mayor estabilidad y una solubilidad potenciada en disolventes orgánicos, así como una farmacocinética más favorable con menos efectos secundarios que la rapamicina (sirolímús). El everolímús se ha
15 usado junto con una microemulsión de ciclosporina (Neoral[®], Novartis) para aumentar la eficacia del régimen inmunosupresor (Kovarik JM, *et al.* "Exposure-response relationship for Certican in de novo kidney transplantation: define a therapeutic range". Transplantation 2002; 73(6): 920-925).

20 La complejidad del estado clínico y las diferencias individuales en sensibilidad a los efectos inmunosupresores y nefrotóxicos han sido bastante problemáticos para que los médicos equilibraran entre eficacia terapéutica y aparición de efectos secundarios (Wallemacq, Pierre E. "Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we?" Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (2004), 42 (11), 1204-1211). La monitorización terapéutica de fármacos (MTF), definida como la medida e interpretación de la concentración de estos fármacos en fluidos biológicos, con el objetivo final de la predicción de respuestas orgánicas, se ha convertido en una parte integral de los protocolos de trasplante.

25 Se ha reseñado la concentración terapéutica de everolímús (Kovarik *et al.*) como de 3-15 ng/ml, que era coherente con eficacia con minimización de efectos adversos en trasplante de riñón. Los datos recientes han mostrado también que la monitorización terapéutica de fármacos (MTF) de everolímús beneficiaría a pacientes de trasplante de corazón (Starling, Randall C; *et al.* "Therapeutic drug monitoring for everolimus in heart transplant recipients based on exposure-effect modeling". American Journal of Transplantation (2004), 4(12), 2126-2131). Las
30 concentraciones mínimas de everolímús eran estables en el primer año después del trasplante y promediaban $5,2 \pm 3,8$ y $9,4 \pm 6,3$ ng/ml en pacientes tratados con 1,5 y 3 mg/día, respectivamente.

35 Se ha reseñado la MTF de everolímús (McMahon LM, *et al.* "High-throughput analysis of everolimus (RAD001) and cyclosporin A (CsA) in whole blood by liquid chromatography/ mass spectrometry using a semi-automated 96-well solid-phase extraction system". Rapid Comm. Mass Spectrometry 2000; 14: 1965-1971; Brignol N, *et al.* "High-throughput semi-automated 96-well liquid/liquid extraction and liquid chromatography/mass spectrometric analysis of Certican (RAD001) and cyclosporin A (CsA) in whole blood". Rapid Communications in Mass Spectrometry 2001; 15: 898-907; Streit F. *et al.* "Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood". Clinical Chemistry. 2002; 48(6): 955-958). Sin embargo, los procedimientos que usan HPLC y CL/EM pueden ser impracticables para uso comercial debido, por ejemplo, al largo tiempo de preparación de la muestra, al largo tiempo de ensayo, al alto coste y a procedimientos trabajosos. Para MTF rutinaria de everolímús, es deseable la disponibilidad de pruebas automatizadas sencillas y analizadores clínicos de alto rendimiento.

45 El documento US6328970 (B1) da a conocer conjugados de rapamicina que pueden usarse como moléculas inmunogénicas para la generación de anticuerpos específicos de rapamicina o un derivado de la misma, para medir los niveles de rapamicina o derivados de la misma, para aislar proteínas de unión a rapamicina y para detectar anticuerpos específicos de rapamicina o derivados de la misma. El documento US6328970 da a conocer también anticuerpos monoclonales específicos de rapamicina o un derivado de anillo abierto de rapamicina.

50 El documento US2002022717 (A1) da a conocer anticuerpos monoclonales de rapamicina y se dan a conocer derivados 40-O-alkilados de rapamicina, junto con haptenos novedosos, conjugados inmunogénicos y procesos para prepararlos y kits de ensayo para usarlos.

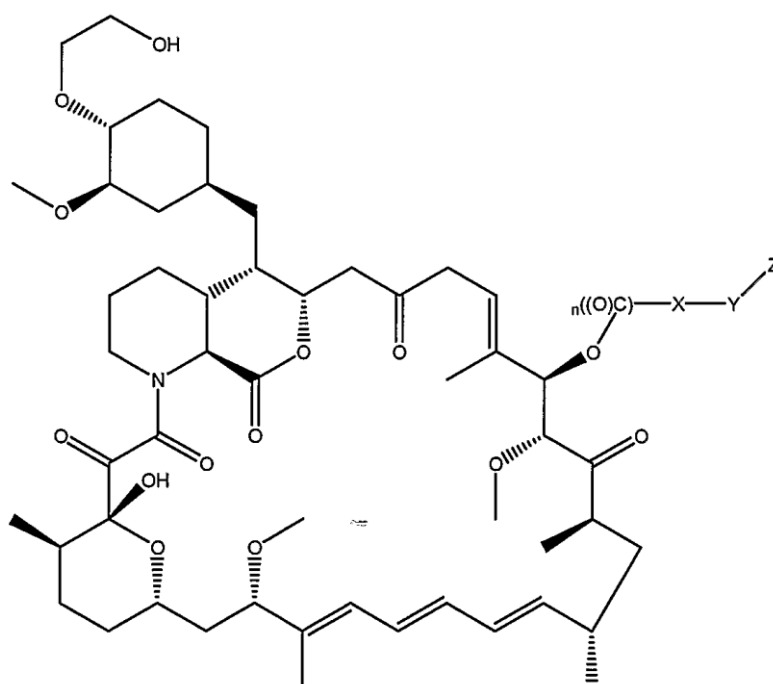
SUMARIO DE LA INVENCIÓN

55 La presente invención está dirigida a derivados novedosos de everolímús y a inmunógenos novedosos de everolímús. La presente invención está también dirigida a anticuerpos policlonales y monoclonales generados usando inmunógenos de everolímús, así como a competidores y trazadores marcados. Estos anticuerpos, conjugados y trazadores son útiles en inmunoensayos para la detección de everolímús en fluidos biológicos.

En un aspecto de la invención, que se describe pero no se reivindica, se proporcionan inmunoensayos competitivos para determinar la presencia de everolímús en una muestra. Los inmunoensayos competitivos ilustrativos comprenden un anticuerpo capaz de unirse específicamente a everolímús, y un compuesto de everolímús conjugado con un marcador detectable, en los que el compuesto de everolímús conjugado se configura para competir con el everolímús en la muestra para unión al anticuerpo, y en los que el marcador proporciona una señal indicativa de la concentración de everolímús en la muestra cuando el everolímús en la muestra está presente a concentraciones de monitorización terapéutica de fármacos. En una realización, el inmunoensayo es adecuado para monitorizar everolímús en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 ng/ml. En otra realización, el inmunoensayo competitivo proporciona una señal indicativa de la concentración de everolímús en un intervalo más amplio, ilustrativamente de aproximadamente 0 a aproximadamente 40 ng/ml.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para determinar la concentración de everolímús en una muestra. Los procedimientos son como se definen en la reivindicación 1.

En aún otro aspecto de la invención, que se describe pero no se reivindica, se proporcionan compuestos que tienen la siguiente estructura



Fórmula II

en la que

n es 0 o 1;

X es una cadena ligadora que comprende 3-10 átomos de carbono o heteroátomos, en la que la cadena ligadora puede estar sustituida o no sustituida y puede ser lineal o ramificada;

Y se selecciona del grupo consistente en -C(O)-, -NH-, -S-, -CH₂- y -O-; y

Z es un portador antigénico o un marcador.

En una realización ilustrativa particular, X es -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, Y es -C(O)- y Z es el portador antigénico.

Los anticuerpos producidos usando dichos compuestos se describen también pero no se reivindican. Se proporcionan también kits de inmunoensayo que usan los anticuerpos, estos kits para determinar la concentración de everolímús en una muestra son como se definen en la reivindicación 5.

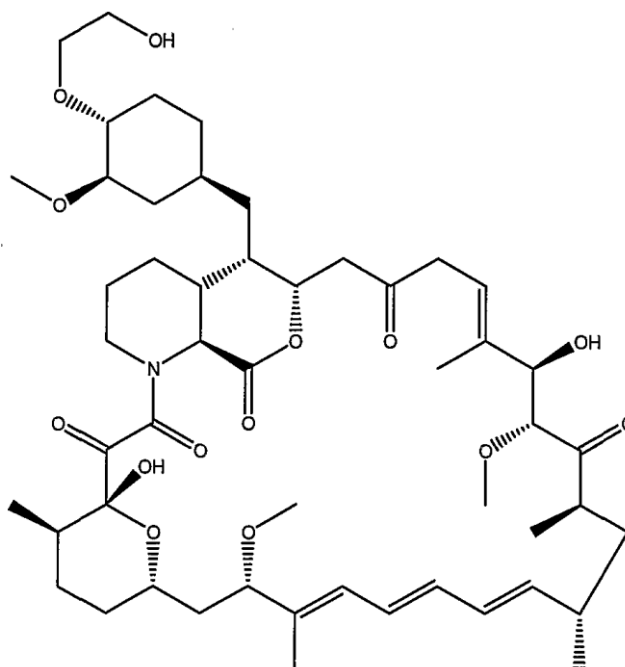
Resultarán evidentes rasgos adicionales de la presente invención para los expertos en la materia tras la consideración de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas, que ejemplifican el mejor modo de llevar a cabo la invención como se entiende actualmente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- La Fig. 1 muestra la estructura de un derivado de everolimús ilustrativo de la presente invención,
 La Fig. 2 muestra la síntesis de formiato de RAD anclado,
 La Fig. 3 muestra la síntesis de RAD-ácido (desprotección),
 5 La Fig. 4 muestra la síntesis de RAD-822 (activación de NHS),
 La Fig. 5 muestra la síntesis de RAD 822: trazador FAMCO-E FP,
 La Fig. 6 muestra la síntesis de RAD 822: inmunógeno de BSA,
 La Fig. 7 muestra la estructura de un derivado 32-oxima de everolimús,
 La Fig. 8 muestra un éster activado del derivado 32-oxima de la Fig. 8,
 10 La Fig. 9 muestra una curva de calibración de (FPIA): eje X- valores del patrón, eje Y- índice (mP) de anticuerpos (policlonales), trazador FP (RAD822:FAMCO-E),
 La Fig. 10 muestra la comparación de un ensayo de FPIA de everolimús según la presente invención frente a CL/EM en pacientes de trasplante de riñón,
 La Fig. 11 muestra la comparación de un ensayo de FPIA de everolimús según la presente invención frente a CL/EM en pacientes de trasplante de corazón, y
 15 La Fig. 12 es una curva de calibración QMS de everolimús (anticuerpo: anticuerpo policlonal del inmunógeno RAD 822; antígeno: RAD 822: trazador FAMCO-E), derivado acoplado a las partículas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- El "everolimús" es un fármaco inmunosupresor comercializado por Novartis AG con la marca comercial CERTICAN®.
 20 El everolimús tiene la estructura de fórmula I:



Fórmula I

- Los "haptenos" son antígenos parciales o incompletos. Son habitualmente sustancias exentas de proteínas, mayoritariamente de bajo peso molecular, que no son generalmente capaces de estimular la formación de anticuerpos, pero que reaccionan con anticuerpos. Los anticuerpos pueden formarse acoplado un hapteno con un portador antigénico de alto peso molecular e inyectando entonces este producto acoplado, concretamente inmunógeno, en un sujeto humano o animal. El everolimús es un hapteno.
 25

La frase “anticuerpo capaz de unirse específicamente a everolímús” como se usa en la presente memoria hace referencia a un anticuerpo con la capacidad de reaccionar con al menos un epítopo en el fármaco en una verdadera reacción de anticuerpo-antígeno, en contraposición a una interacción no específica.

5 El término “análogo” o “derivado” hace referencia a un compuesto químico o molécula preparados a partir de un compuesto o molécula original mediante una o más reacciones químicas.

Un “hapteno activado” hace referencia a un derivado de hapteno que se ha proporcionado con un sitio de reacción disponible, tal como por la unión de un grupo ligador, para sintetizar un conjugado derivado de hapteno.

10 Como se usa en la presente memoria, un “grupo ligador” o “ligador” hace referencia a una porción de la estructura química que conecta dos o más subestructuras tales como haptenos, portadores, inmunógenos, marcadores, trazadores u otros ligadores. Un grupo ligador tiene al menos una cadena ininterrumpida de átomos distintos de hidrógeno (u otros átomos monovalentes) que se extiende entre las subestructuras. Los átomos de un grupo ligador y los átomos de una cadena en un grupo ligador están conectados entre sí por enlaces químicos. Los ligadores pueden ser cadenas carbonadas lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas. Pueden incluir también uno o más heteroátomos en la cadena o en los extremos de las cadenas. Se entiende por “heteroátomos” átomos distintos de átomos de carbono, ilustrativamente oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. El grupo ligador puede incluir también grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como sustitución en uno de los átomos de la cadena. El número de átomos en un grupo ligador o ligador se determina contando los átomos distintos de hidrógeno. El número de átomos en una cadena de un grupo ligador se determina contando el número de átomos distintos de hidrógeno a lo largo de la ruta más corta entre las subestructuras que se están conectando. Los grupos ligadores pueden usarse también para activar un hapteno, por ejemplo, proporcionar un sitio disponible en un hapteno para sintetizar un conjugado de un hapteno con un marcador o portador.

Los términos “inmunógeno” e “inmunogénico” como se usan en la presente memoria hacen referencia a sustancias capaces de producir o generar una respuesta inmunitaria en un organismo.

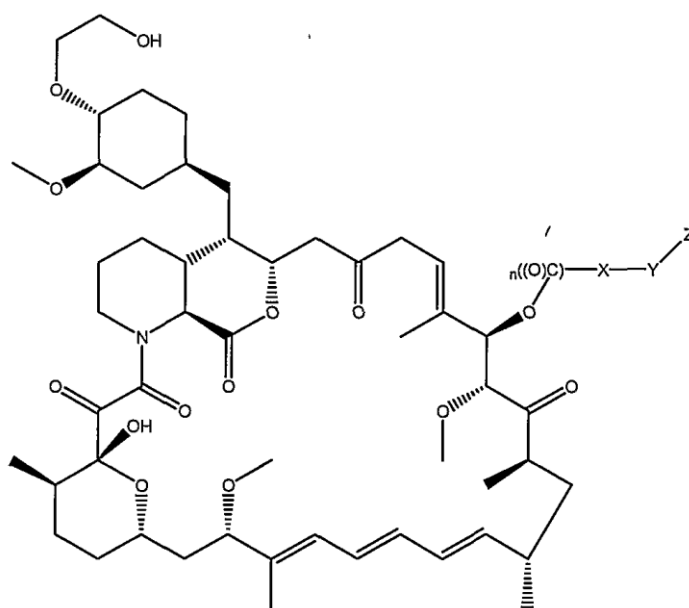
25 Un “éster activo” hace referencia a un grupo éster que puede reaccionar con un grupo amino libre de un compuesto tal como, por ejemplo, péptidos y proteínas. Los ejemplos de ésteres activos incluyen *N*-hidroxisuccinimida, *p*-nitrofenilo, pentafluorofenilo y *N*-hidroxibenzotriazolilo.

30 Un “portador” o “portador inmunogénico”, como se usan los términos en la presente memoria, es una sustancia inmunogénica, comúnmente una proteína, que puede unirse a un hapteno, posibilitando así que el hapteno induzca una respuesta inmunitaria y desencadene la producción de anticuerpos que pueden unirse específicamente con el antígeno (hapteno). Las sustancias portadoras incluyen proteínas, glucoproteínas, polisacáridos complejos, partículas y ácidos nucleicos que se reconocen como extraños y desencadenan así una respuesta inmunológica por el hospedador. Pueden emplearse diversas proteínas como portador inmunogénico poli(aminoácido). Estas proteínas incluyen albúminas y seroproteínas, por ejemplo, globulinas, proteínas del cristalino, lipoproteínas, etc. Las proteínas ilustrativas incluyen seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa bocallave (KLH), ovoalbúmina de huevo, gamma-globulina bovina (BGG), etc. Como alternativa, pueden usarse poli(aminoácidos) sintéticos. El portador inmunogénico puede ser también un polisacárido, que es un polímero de alto peso molecular constituido por condensaciones repetidas de monosacáridos. Son ejemplos de polisacáridos almidones, glucógeno, celulosa, gomas de carbohidratos tales como goma arábica, agar y demás. El polisacárido puede contener también residuos de poli(aminoácidos) y/o residuos de lípidos. El portador inmunogénico puede ser también un poli(ácido nucleico) solo o conjugado con uno de los poli(aminoácidos) o polisacáridos mencionados anteriormente. El portador inmunogénico puede ser también una partícula. Las partículas son ilustrativamente de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros (μm) e ilustrativamente de no más de aproximadamente 100 μm , y habitualmente de aproximadamente 0,05 μm a 10 μm de diámetro. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, opcionalmente de una densidad similar a la del agua, generalmente de aproximadamente 0,5 a 1,5 g/ml, y compuesta por material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, incluyendo ejemplos no limitantes tales como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y virus. Las partículas pueden constar también de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, látex, vesículas fosfolipídicas o lipoproteínas.

50 “Poli(aminoácido)” o “polipéptido” es una poliamida formada a partir de aminoácidos. Los poli(aminoácidos) estarán ilustrativamente en el intervalo de peso molecular de aproximadamente 2.000, sin límite superior de peso molecular, siendo normalmente de menos de 10.000.000 y opcionalmente de no más de aproximadamente 600.000 Da. Habrá habitualmente diferentes intervalos, dependiendo de si está implicado o no un portador inmunogénico o una enzima.

55 Un “péptido” es cualquier compuesto formado mediante el ligamiento de dos o más aminoácidos por enlaces amida (peptídicos), habitualmente un polímero de α -aminoácidos en que el grupo α -amino de cada residuo aminoácido (excepto el extremo NH_2) está ligado al grupo α -carboxilo del siguiente residuo de una cadena lineal. Los términos “péptido”, “polipéptido” y “poli(aminoácido)” se usan como sinónimos en la presente memoria para hacer referencia a esta clase de compuestos sin restricción en cuanto a tamaño. Se hace referencia también a los miembros mayores de esta clase como proteínas.

- Un “marcador”, “molécula detectora” o “trazador” es cualquier molécula que produce, o puede inducirse a producir, una señal detectable. El marcador puede conjugarse con un analito, un inmunógeno o un anticuerpo, ilustrativamente el anticuerpo producido en respuesta al compuesto antigénico o un anticuerpo secundario que tiene especificidad por el mismo, o con otra molécula tal como un receptor o una molécula que puede unirse a un receptor tal como un ligando, particularmente un hapteno. Los ejemplos no limitantes de marcadores incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fragmentos de enzimas, sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, coenzimas, catalizadores, fluoróforos, tintes, productos quimioluminiscentes, luminiscentes, sensibilizadores, partículas no magnéticas o magnéticas, soportes sólidos, liposomas, ligandos, receptores e isótopos radiactivos de hapteno.
- El término “compuesto antigénico” como se usa en la presente memoria es un compuesto usado para producir una respuesta inmunitaria. Ilustrativamente, el compuesto antigénico es un hapteno, por ejemplo everolimús, ligado con un portador inmunogénico. El compuesto antigénico se usa para generar los anticuerpos deseados.
- El término “competidor marcado” como se usa en la presente memoria es una molécula capaz de unirse específicamente a anticuerpos que tienen especificidad por everolimús, en los que la molécula está ligada con un marcador detectable o trazador. Ilustrativamente, la molécula es everolimús o un derivado o analito del mismo.
- El término “muestra biológica” incluye, pero sin limitación, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o anteriormente ser vivo. Dichos seres vivos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos, caballos y otros animales. Dicha sustancia incluye, pero sin limitación, sangre, suero, orina, lágrimas, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, linfa, nódulos linfáticos, tejido sinovial, condrocitos, macrófagos sinoviales, células endoteliales y piel.
- El término “concentraciones de monitorización terapéutica de fármacos” hace referencia a las concentraciones del fármaco desde que no proporcionan efecto hasta las de efecto tóxico. Para everolimús, como se entiende actualmente, el intervalo terapéutico es generalmente de 3-15 ng/ml. Sin embargo, se entiende que puede ser útil proporcionar información sobre un intervalo más amplio, y el intervalo de ensayo es generalmente más amplio que el intervalo terapéutico. Por consiguiente, los ensayos que monitorizan las concentraciones de monitorización terapéutica de fármacos pueden proporcionar sensibilidad a lo largo de un intervalo más amplio de concentraciones de everolimús.
- El término “paciente” incluye sujetos humanos y animales.
- Son conocidos numerosos formatos de inmunoensayo cuantitativo para detectar un hapteno tal como un fármaco u otra molécula pequeña en un fluido corporal. Un procedimiento de ensayo para everolimús incluye ilustrativamente la muestra con un anticuerpo anti-everolimús y detectar la cantidad de complejo de anticuerpo anti-everolimús/everolimús, como indicativa de la cantidad de everolimús en la muestra.
- Los inmunoensayos ilustrativos emplean anticuerpos policlonales y/o anticuerpos monoclonales con una sensibilidad y especificidad apropiadas por everolimús que proporcionan información sobre las concentraciones de everolimús estadísticamente comparable con la obtenida mediante procedimientos analíticos tales como CL/EM. Dichos inmunoensayos son ilustrativamente útiles en la monitorización de los niveles de fármaco en las muestras de paciente.
- Diseñar un inmunoensayo para la detección de una molécula pequeña tal como un fármaco puede ser un reto. Dichas moléculas pequeñas a menudo carecen de antigenicidad, haciendo difícil generar anticuerpos. Esto es particularmente problemático con fármacos tales como everolimús, que suprime la respuesta inmunitaria. Para aumentar la inmunogenicidad, se conjugan con el fármaco compuestos antigénicos mayores, ilustrativamente proteínas o polipéptidos incluyendo, pero sin limitación, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, hemocianina de lapa bocallave y similares. Además, la detección del fármaco en un inmunoensayo requiere generalmente el uso de un marcador detectable conjugado con un anticuerpo, un analito o análogo de analito.
- Los inmunógenos pueden prepararse acoplando everolimús con una proteína portadora antigénica a través de un ligador reaccionado con uno de los grupos hidroxilo, ilustrativamente el hidroxilo en posición 28. Dichos procedimientos se describen en la patente de EE.UU. n° 6.635.745 y la patente europea n° EP 0.693.132. Sin embargo, se ha encontrado que un ligador extendido entre el portador antigénico conduce a la producción de anticuerpos más sensibles. Sin ligarse a teoría particular alguna, presuntamente el ligador más largo proporciona un epítopo más accesible, dando como resultado una especificidad aumentada del anticuerpo por everolimús.
- El conjugado inmunogénico es un compuesto mostrado en la Fig. 1 y en la fórmula II siguiente:



Fórmula II

en la que

n es 0 o 1;

- 5 X es una cadena ligadora que comprende 3-10 átomos de carbono o heteroátomos, en la que la cadena ligadora puede estar sustituida o no sustituida y puede ser lineal o ramificada;

Y se selecciona del grupo consistente en carbonilo, -NH-, -S-, -CH₂- y -O-; y

Z es un portador antigénico.

- 10 En esta realización, el ligador (X) comprende una cadena de 3 o más átomos, en la que al menos un átomo es de carbono (C). La molécula ligadora puede ser una cadena lineal o ramificada y, además de al menos un átomo de C, puede contener heteroátomos tales como N, O, S y P, que pueden estar sustituidos independientemente entre sí. El ligador puede contener también enlaces múltiples. Si el ligador está ramificado, las ramas pueden formar anillos. Cuando el ligador está ramificado, la longitud del ligador se determina por el número de átomos en la ruta más corta entre everolimús y conjugado. Ilustrativamente, el ligador (X) comprende una cadena de entre 3 y 10 átomos, más
15 ilustrativamente de entre 4 y 7 átomos, y aún más ilustrativamente de 4 a 5 átomos. En un ejemplo particularmente bien adecuado, el ligador comprende una cadena de 5 átomos. Aunque no sea de la invención, se entiende que pueden prepararse compuestos antigénicos u otros conjugados de everolimús acoplado a través de otras posiciones en la molécula de everolimús, ilustrativamente en uno de los grupos cetona en posiciones 26, 32 o 9, mediante un ligamiento adecuado (por ejemplo, oxima, hidrazona), en los que el ligador tiene suficiente longitud para proporcionar acceso a un epítipo de everolimús adecuado, aunque sin proporcionar demasiada separación entre el everolimús y el portador antigénico. El ligador puede adjuntarse a un grupo funcional adecuado que permita acoplar a una proteína u otra biomolécula, o a una superficie de soporte sólido.

- 25 En un ejemplo particular, n= 1, X es una cadena de 5 átomos e Y es -C(O)-. Es un ejemplo de dicho compuesto inmunogénico RAD 822:BSA, como se muestra en la Fig. 6, en la que Z es BSA. Los anticuerpos preparados usando RAD 822:BSA han probado demostradamente una fuerte unión (> 100 mP) y una fuerte inhibición (> 50% a 50 ng/ml), como se muestra en la curva de calibración de la Fig. 9. Es otro de dichos ejemplos en el que se espera una fuerte unión y fuerte inhibición los anticuerpos producidos usando un compuesto inmunogénico de fórmula II en la que n= 1, X es una cadena de 7 átomos (por ejemplo -(CH₂)₇-), e Y es -C(O)-. Se espera que los anticuerpos producidos usando otros compuestos de fórmula II demuestren también una fuerte unión y fuerte inhibición. Se
30 entiende, sin embargo, que puede ser aceptable una unión media (50-100 mP) y/o una inhibición media (50% a 50-500 ng/ml) para algunas realizaciones. Los anticuerpos generados a partir de los compuestos de fórmula II son bien adecuados para ensayos competitivos y no competitivos.

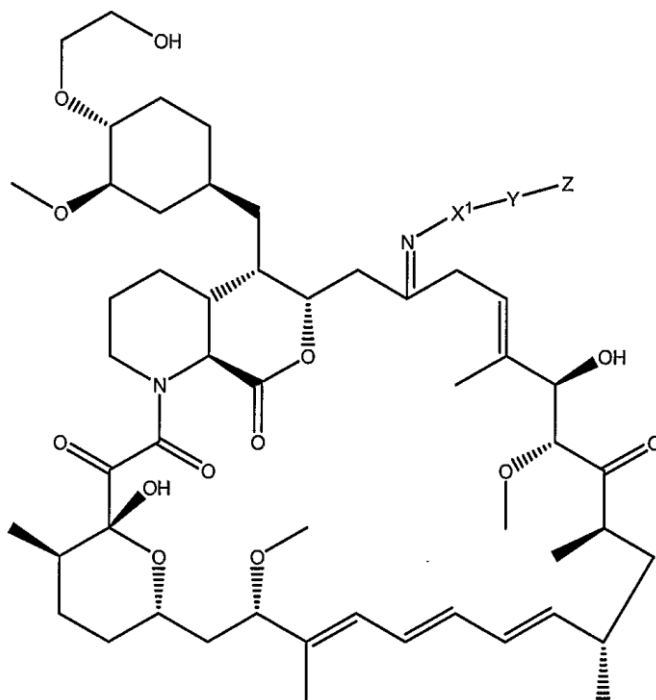
- 35 El conjugado inmunogénico es útil para la generación de anticuerpos policlonales así como monoclonales. Dependiendo del fin del sistema de detección, los anticuerpos pueden seleccionarse para orientarse a everolimús con poca o ninguna reactividad cruzada por metabolitos, o como alternativa, pueden seleccionarse anticuerpos con la capacidad de reconocer uno o más de los metabolitos y/o fármacos relacionados así como everolimús. Un estudio integral de la biotransformación de everolimús por microsomas hepáticos humanos ha identificado al menos 11

metabolitos resultantes de la hidroxilación y desmetilación de everolímús (Bornsen KO, *et al.* "Electrospray ionization and collisionally induced dissociation of RADO01 and related compounds and structural characterization of RADO01 metabolites by nano-spray and micro liquid chromatography mass spectrometry", Jacobson W, *et al.* "Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD". Transplantation Proceedings 2001; 33: 614-615), siendo los metabolitos principales hidroxil-(24/25 OH RAD, 46 OH RAD), compuestos de anillo abierto (RAD SA, RAD PSA) y 40-fosfatidilcolina-RAD (RAD PC). La generación de metabolitos de everolímús se atribuye al citocromo P450 3A4, el más abundante de las enzimas CYP en hígado e intestino, también implicado en el metabolismo de ciclosporina (CsA) y rapamicina. Ilustrativamente, si se desean anticuerpos capaces de distinguir everolímús de sus metabolitos, pueden inducirse opcionalmente anticuerpos mediante inmunógenos preparados a partir de derivados de 28-O.

Además de inmunógenos, pueden prepararse otros conjugados de everolímús. Cuando se usa el ligamiento a través de la posición 28-O para producir una molécula competidora marcada, la Z de la fórmula II puede ser biotina, peroxidasa de rábano picante u otras enzimas, marcadores fluorescentes y tintes, o partículas tales como soles metálicos, partículas de látex, partículas de poliestireno y similares, o cualquier otro marcador, molécula detectora o trazador, como se discute anteriormente. Dichos conjugados se forman mediante cualquier serie de procedimientos rutinarios bien conocidos por los expertos en la materia. Es posible preparar conjugados de everolímús que sean útiles para una variedad de inmunoensayos incluyendo, pero sin limitación, inmunoensayo de polarización de fluorescencia, inmunoensayo de donante de enzima clonada, inmunoensayo de flujo lateral, ensayos de micropartículas quimioluminiscentes y ensayos inmunturbidimétricos. Se describen varias realizaciones en la presente memoria.

Aunque no de la invención, los anticuerpos pueden producirse usando un compuesto antigénico de fórmula II, por ejemplo RAD 822:BSA, como se muestra en la Fig. 6. En un ensayo competitivo no de la invención, el competidor marcado puede derivar de everolímús usando un ligamiento que es el mismo o similar al del compuesto antigénico, por ejemplo, RAD 822:FAMCO-E, como se muestra en la Fig. 5. Sin embargo, se entiende que cuando el competidor marcado sea un derivado de 28-O de everolímús, la cadena ligadora, como se representa por X en la fórmula II, no está limitada a una cadena que comprende 3-10 átomos. En algunos ensayos competitivos, es deseable tener un competidor marcado que se una al anticuerpo con menos especificidad que el everolímús se une al anticuerpo, permitiendo desplazar el competidor marcado más fácilmente en presencia de everolímús. Por consiguiente, pueden ser deseables ligadores más cortos para limitar el acceso a los sitios de unión a anticuerpo y para debilitar la unión específica con el anticuerpo. Los ligadores más largos de 10 átomos pueden ser también útiles, ya que la distancia entre el marcador y el everolímús no es crítica en muchas realizaciones. Por tanto, se entiende que el ligador del competidor marcado no está limitado a la definición de X en la fórmula II.

El competidor marcado de la invención deriva de everolímús usando el ligamiento mostrado en la fórmula III:



Fórmula III

35

en la que

X¹ es una cadena ligadora que comprende uno o más átomos, cada uno de los cuales puede estar sustituido o no sustituido y puede ser ramificado o no ramificado;

Y es como se define anteriormente y

Z es un marcador como se define anteriormente.

- 5 Para un competidor marcado, la estructura del ligador X¹ puede elegirse basándose en el ensayo particular. Como se discute anteriormente, puede ser deseable proporcionar un ligador corto que tenga solo uno o dos átomos en la cadena (ilustrativamente -O-CH₂-), para reducir la unión específica al anticuerpo. Por otro lado, puede ser deseable proporcionar un ligador largo, ilustrativamente cuando el everolimús del competidor marcado se está anclando a un soporte sólido, y se desea una flexibilidad adicional en la cadena ligadora. El ligador más largo puede comprender una cadena de cualquier longitud, ilustrativamente de 10 a 100 átomos.

10 Un ensayo competitivo ilustrativo usa anticuerpos producidos usando un compuesto antigénico de fórmula II, ilustrativamente RAD 822:BSA, como se muestra en la Fig. 6, y un competidor marcado de fórmula III, ilustrativamente el compuesto de 32-oxima mostrado en la Fig. 7, en la que la succinimida se reemplaza por un marcador adecuado para un inmunoensayo competitivo. Para FPIA, el marcador puede ser FAMCO-E, aunque pueden usarse otros marcadores o trazadores adecuados. Puesto que el fármaco no unido everolimús tiene mayor afinidad por el anticuerpo (producido a partir del inmunógeno RAD 822:BSA) que el derivado de 32-oxima marcado, una cantidad muy pequeña de everolimús no unido en una muestra debería tener un efecto detectable sobre la velocidad de aglutinación regida por el derivado de oxima unido. Por tanto, si el derivado de 32-oxima marcado se inmoviliza, por ejemplo, sobre látex, puede conseguirse una alta sensibilidad (necesaria para la detección de everolimús debido al intervalo terapéutico extremadamente bajo y estrecho de 3-15 ng/ml).

15 Los ligamientos de oxima son más estables a la escisión hidrolítica que los enlaces éster. Además, se ha encontrado que el derivado de oxima (en posición 32) no experimentará una reacción de eliminación en las condiciones más útiles. El derivado de oxima (éster activado) sería un candidato deseable en diversos ensayos, incluyendo ensayos inmunoturbidimétricos potenciados con látex. Las micropartículas acopladas con derivado de oxima han mostrado una estabilidad mejorada.

20 Se entiende que puede usarse cualquier combinación de anticuerpos producidos usando los compuestos antigénicos anteriormente descritos y los competidores marcados anteriormente descritos en los ensayos competitivos, dependiendo la elección de cada uno del ensayo específico y la sensibilidad deseada.

Inmunoensayo de polarización de fluorescencia de everolimús

30 La tecnología de inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) está basada en la unión competitiva entre un antígeno/fármaco en una muestra y una concentración conocida de antígeno/fármaco marcado. El FPIA se describe en la patente de EE.UU. n° 4.593.089. En el sistema de ensayo, el antígeno de muestra tal como everolimús compite con el antígeno marcado con fluoresceína o análogo de antígeno por un número fijo de sitios de anticuerpo. Los componentes principales del sistema de FPIA son: i) anticuerpo capaz de unirse específicamente al antígeno/fármaco, ii) muestra sospechosa de contener el antígeno/fármaco y iii) el antígeno/fármaco o análogo marcado con fluoresceína. Debido a las propiedades rotacionales de las moléculas en solución, el grado de polarización es directamente proporcional al tamaño de la molécula. La polarización aumenta a medida que aumenta el tamaño molecular. Cuando se usa luz polarizada linealmente para excitar el antígeno/fármaco marcado con fluoresceína, que es pequeño y rota rápidamente en solución, se despolariza significativamente la luz emitida. Cuando se une el antígeno/fármaco marcado con fluoresceína al anticuerpo, se retarda la rotación y la luz emitida se polariza en gran medida. Las cantidades aumentadas de antígeno/fármaco no marcado en la muestra darán como resultado una unión reducida de antígeno-fármaco marcado con fluoresceína al anticuerpo, y una polarización reducida de la luz emitida por la muestra. En los presentes ejemplos, se establece la relación precisa entre la polarización y la concentración de everolimús no marcado en la muestra midiendo los valores de polarización de los patrones de concentración conocida de everolimús.

Inmunoensayo de micropartículas homogéneas (inmunoturbidimétrico) para everolimús

Formato A:

50 En una realización, se proporciona un kit con un conjunto de reactivos líquidos usados para efectuar ensayos inmunoturbidimétricos para la medida de las concentraciones de everolimús en sangre completa, sangre hemolizada, suero o plasma. En esta tecnología, se carga un conjugado de everolimús, ilustrativamente un conjugado de everolimús activado en 28-O, sobre una micropartícula, por ejemplo cualquiera de las micropartículas fabricadas y/o comercializadas por Seradyn, Inc. (Indianápolis, Indiana) incluyendo, pero sin limitación, de poliestireno o poliestireno modificado con carboxilato y partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Se formula un anticuerpo capaz de unirse específicamente a everolimús en un sistema tamponador estándar. Tiene lugar una reacción competitiva entre el everolimús inmovilizado sobre las micropartículas y el everolimús en la muestra del paciente por la unión a una cantidad limitada de anticuerpo anti-everolimús en la solución de reacción. La aglutinación de partículas se inhibe por la presencia de fármaco en la muestra del paciente.

Formato B:

Esta realización es similar a la descrita anteriormente como formato A, excepto porque se carga sobre la micropartícula un anticuerpo capaz de unirse específicamente a everolimus. Se liga un derivado de everolimus, ilustrativamente everolimus activado en 28-O, con la macromolécula de elección, por ejemplo seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, dextrano y similares, formando un conjugado de fármaco. Tiene lugar una reacción competitiva entre el conjugado de fármaco en la solución tamponada y el everolimus en la sangre del paciente por la unión a anticuerpo anti-everolimus inmovilizado sobre las micropartículas. La aglutinación de partículas está inhibida por la presencia de fármaco en la muestra del paciente.

Tecnología de inmunoensayo de donante de enzima clonada CEDIA[®] para everolimus

La CEDIA[®] (marca comercial de Roche) ha probado ser un procedimiento altamente exacto para la cuantificación de fármacos terapéuticos. La CEDIA[®] es el objeto de varias patentes, incluyendo la patente de EE.UU. n° 4.708.929, que reivindica procedimientos de ensayo homogéneo competitivo, la patente de EE.UU. n° 5.120.653, que reivindica una secuencia de ADN recombinante que codifica el fragmento donante de enzima y un hospedador para dicho vector, la patente de EE.UU. n° 5.604.091, que reivindica secuencias aminoacídicas del fragmento donante de enzima, y la patente de EE.UU. n° 5.643.734, que enseña kits para ensayos de CEDIA[®].

La CEDIA está basada en la competición de un fármaco en la muestra biológica con fármaco conjugado con el fragmento donante de enzima (ED) genomanipulado inactivo de β -D-galactosido galactohidrolasa (E.G. 3.2.1.23) o β -galactosidasa (β gal) de *E. coli* por la unión a un anticuerpo capaz de unirse específicamente al fármaco diana. Si el fármaco diana está presente en la muestra, se une al anticuerpo, dejando la porción de ED del conjugado de ED-fármaco libre para recuperar la actividad enzimática tras asociación con fragmentos aceptores de enzima (EA), también de β -D-galactosido galactohidrolasa (E.C. 3.2.1.23) o β -galactosidasa (β -gal) de *E. coli*, en la mezcla de reacción de ensayo. La enzima activa es entonces capaz de producir un producto de reacción cuantificable cuando se expone a un sustrato apropiado. Es un sustrato ilustrativo rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido (CPRG), escindido por la enzima activa en galactosa y CPR. El CPR se mide mediante la absorbancia a 570 nm de longitud de onda. Si no está presente fármaco en la muestra, el anticuerpo se une al conjugado de ED-fármaco, inhibiendo la asociación de los fragmentos de ED con los fragmentos de EA, e inhibiendo por tanto la recuperación de la actividad enzimática. La cantidad de producto de reacción y el cambio de absorbancia resultante son proporcionales a la cantidad de fármaco en la muestra.

Inmunoensayo heterogéneo quimioluminiscente

En una realización, un ensayo competitivo que usa la tecnología de inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA) consta del uso de anticuerpos capaces de unirse específicamente a everolimus acoplado con partículas, en particular partículas magnéticas o partículas adecuadas para separación por filtración, sedimentación u otros medios. Un marcador que comprende everolimus ligado con una molécula quimioluminiscente adecuada, por ejemplo un éster de acridinio, compite con el everolimus libre en la muestra del paciente por la cantidad limitada de anticuerpo anti-everolimus sobre la partícula magnética. Después de la etapa de lavado rutinaria para retirar el marcador no unido, se mide la cantidad de quimioluminiscencia, expresada en unidades lumínicas relativas (ULR). La cantidad de quimioluminiscencia está inversamente relacionada con la cantidad de fármaco libre en la muestra del paciente y la concentración se determina construyendo una curva estándar usando valores conocidos del fármaco.

Otros formatos de inmunoensayo

Los derivados, anticuerpos, inmunógenos y/u otros conjugados descritos en la presente memoria son también adecuados para uso con cualquiera de una serie de otros inmunoensayos homogéneos y heterogéneos con una serie de sistemas de detección. Los ejemplos presentados en la presente memoria no se pretende que sean limitantes.

Por tanto, la presente invención proporciona derivados de everolimus que son útiles para la preparación de inmunógenos y conjugados para uso en inmunoensayos para la detección de everolimus. Al acoplar un análogo de everolimus según la presente invención con un material portador inmunogénico, pueden producirse y aislarse anticuerpos policlonales o monoclonales que son reactivos útiles para inmunoensayos para la detección de everolimus.

Puede lograrse el acoplamiento mediante cualquier reacción química que una el marcador o portador. Este ligamiento puede lograrse mediante una variedad de mecanismos químicos, por ejemplo, unión covalente, unión por afinidad, intercalado, unión coordinada y complejación. Lo más a menudo, el ligamiento se realiza mediante enlace covalente. El enlace covalente puede conseguirse por condensación directa de cadenas laterales existentes o por la incorporación de moléculas de puente externas. Muchos agentes ligantes divalentes o polivalentes son útiles para acoplar moléculas de proteína, tales como un portador, a otras moléculas. Los agentes de acoplamiento representativos incluyen compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametildiaminas. Se entiende que este

listado no es una recopilación exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la materia sino que, en lugar de ello, es representativo de los agentes de acoplamiento más comunes.

5 Los inmunoensayos de everolimús ilustrativos emplean anticuerpos anti-everolimús que pueden ser policlonales o monoclonales. En inmunoensayos competitivos ilustrativos, la preparación del anticuerpo usado se induce por un inmunógeno descrito en la presente memoria formulado en una solución acuosa tal como un tampón y similar, o proporcionado en un coadyuvante o composición similar. Los anticuerpos inducidos pueden ensayarse para determinar la especificidad por everolimús.

EJEMPLO 1- Síntesis de compuestos inmunogénicos y competidores marcados.

Síntesis de monoformiato de RAD

10 Se disolvieron 0,6 g de RAD en 2 ml de cloruro de metileno seco en un matraz de fondo redondo de 100 ml en atmósfera de argón (Ar). Se separó una alícuota (~10 µl) para ensayos de HPLC y TLC. Se dispuso el matraz de fondo redondo que contenía la solución de reacción en un baño de hielo/NaCl aproximadamente a -20°C. Se dejó enfriar el matraz de reacción durante 3-5 min. Se añadió piridina seca (0,25 ml) usando una jeringuilla de vidrio seca con una aguja metálica (de 15 cm) de una vez. Se añadieron 0,35 ml de cloroformiato de alilo seco usando una
15 jeringuilla de vidrio seca con una aguja de metal (de 15 cm) en aproximadamente 0,5-1 min. Poco después de la adición, apareció precipitación. Se dejó agitar durante 1 hora. Se inactivó la reacción añadiendo 5 ml de NaHCO₃ saturado. Se extrajo la reacción inactivada con cloruro de metileno. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron (Na₂SO₄) y se filtraron. Se transfirió el filtrado a un matraz de fondo redondo de 250 ml (100-250 ml) y se evaporaron los productos volátiles a presión reducida (baño de agua a menos de +30°C). Se purificó el producto bruto por
20 cromatografía de sílice en 40% de acetato de etilo en cloruro de metileno. El rendimiento del producto final era de 0,53 g.

Síntesis de formiato de RAD anclado (Fig. 2)

25 Se dispusieron 0,4 g de monoformiato de RAD, 9 mg de DMAP y 0,2 g de éster alílico del ácido pimélico en un matraz de fondo redondo de 50 ml seco equipado con una barra de agitación. Se añadieron 5 ml de CH₂Cl₂ seco al matraz anterior, que se dispone en un baño de hielo/agua a 0°C en atmósfera de argón. Se dejó enfriar la solución durante 5-10 min. Se añadieron rápidamente 0,2 g de DCC. Se dejó agitar la reacción durante 5 horas a 0°C. Se recogió el DCU precipitado en un filtro Whatman n° 1. Se aclararon matraz y precipitado con aproximadamente 10 ml de CH₂Cl₂ enfriado con hielo, se combinaron y se lavó la fase orgánica con HCl 1 M enfriado con hielo y bicarbonato de sodio acuoso saturado, se secó sobre Na₂SO₄, se decantó (o filtró), se aclaró el sólido con 2 x 5 ml de CH₂Cl₂ y se concentró el producto bruto a vacío, proporcionando 0,45 g. Puede conseguirse una purificación adicional por
30 cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice con acetato de etilo/cloruro de metileno (1:1).

Síntesis de RAD-ácido (desprotección) (Fig. 3)

35 Se dispusieron 0,362 g de RAD protegido en atmósfera de argón en un matraz de fondo redondo ámbar seco equipado con una barra de agitación y un sello de caucho a temperatura ambiente. Se dejaron calentar los reactivos durante al menos 30 min a temperatura ambiente para proteger de la condensación de humedad. Se añadieron 5,75 ml de cloruro de metileno seco al matraz de reacción usando una jeringuilla seca (de plástico o vidrio) con aguja seca y se añadieron 73 µl (4 equivalentes) de ácido acético glacial usando una pipeta automática. Se pesaron 7,4 mg (0,02 equivalentes o 2%) de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (Pd(PPh₃)₄) en un papel de pesada y se añadieron a la solución de reacción. Se añadieron gota a gota 260 µl de hidruro de tributilestaño a las mezclas de
40 reacción anteriores a temperatura ambiente. Se dejó agitar la reacción durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente. Se dispuso el matraz en un rotavapor y se condensó el contenido a aproximadamente 2-3 ml de solución. Se cargó la solución en una columna de cromatografía de vidrio corta de 5-6 cm (volumen de SiO₂ seca= 50 cm³, diámetro de aproximadamente 4 cm). Elución: 1°- 200 ml de acetato de etilo, 2°- 200 ml de 10% de acetona en acetato de etilo, 3° 200 ml de 50% de acetona en acetato de etilo, acetona pura aproximadamente 1,5 l.
45 Se recogieron las fracciones de producto y se concentraron a vacío, proporcionando 273 mg de RAD-ácido.

Síntesis de RAD-822 (activación de NHS) (Fig. 4)

50 Se dejaron calentar a temperatura ambiente 0,281 g de RAD-ácido obtenidos en la etapa anterior y se rellenó con argón. Se añadieron rápidamente al matraz de reacción 3,1 mg (0,1 equivalentes) de DMAP, 88 mg (3 equivalentes) de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y 79 mg (1,5 equivalentes) de DCC. Se inició la reacción añadiendo 3,0 ml de cloruro de metileno seco mediante jeringuilla. Se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente durante 1 h agitando en atmósfera de argón. Se dispuso la reacción en un baño de hielo/agua y se dejó agitar durante 2 h adicionales. Al final de este tiempo, se añadieron 1,5 ml de hexano y se detuvo la agitación. Se filtró la urea precipitada (DCU) a través de un tapón de algodón usando una pipeta Pasteur. Se extrajo la fase orgánica secuencialmente con volúmenes iguales de HCl 1,0 M enfriado con hielo, NaCl sat., NaHCO₃ sat. y agua destilada. Se secó la fase
55 orgánica con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. Se disolvió el RAD-822 bruto en aproximadamente 1 ml de CH₂Cl₂ y se cargó en la columna de gel de sílice. Se eluyó la muestra con hexano/acetona (1:1). Se recogió el producto y se concentró a vacío, proporcionando 46 mg.

El RAD-822 puede usarse en diversas realizaciones de la presente invención. Este compuesto se usa en la presente memoria en una realización de FPIA ilustrativa con un ligador modificado con éster en la posición 28. Sin embargo, el RAD 822 puede experimentar degradación química mediante escisión hidrolítica debido a una reacción de eliminación. Por tanto, el RAD 822 no es óptimo para otras realizaciones que requieran condiciones térmicamente estresantes vigorosas, tales como la tecnología QMS[®] (Seradyn, Indianápolis, IN).

Síntesis de RAD 822: trazador FAMCO-E FP (Fig. 5)

Se pesó un matraz de fondo redondo de 100 ml y se pipeteó 1 ml de solución de FAMCO-E a un matraz de fondo redondo de tamaño adecuado. Se sometió a rotavapor el disolvente a presión reducida. Se enrolló el matraz con tapa de plástico con lámina de aluminio y se añadió un agitador magnético al matraz anterior. Se pipeteó 1 ml de solución de DMF al matraz anterior y se agitó a temperatura ambiente durante 40-50 minutos. Se retiró una cantidad suficiente de RAD de un almacenamiento en congelador a -78°C y se dispuso a temperatura ambiente para descongelar. Se pesaron 4 mg de RAD 822 sobre un trozo de papel de pesada y se transfirió el polvo al matraz que contenía la solución de FAMCO-E. Se dejó agitar la reacción bajo presión de argón sobre una placa de agitación magnética durante 1 h en un baño de hielo/agua y entonces durante 30-40 minutos a temperatura ambiente (no más de 2 horas en total). Se evaporó el disolvente a presión reducida (bomba de alto vacío). Se disolvió el producto bruto (0,5-2 ml para un tamaño de lote de 1 mg) en la cantidad mínima de metanol. Se preparó el disolvente de TLC añadiendo 85 ml de CH₂Cl₂ y 15 ml de MeOH. Se dejaron secar al aire las placas durante al menos 60 minutos en una campana de humos operativa, y se despegó la banda trazadora de la placa. Se transfirió el polvo a un embudo de filtro Buchner de 30 ml (porosidad M) y se lavó con 100% de metanol. Se recogió el filtrado y se transfirió a un matraz de fondo redondo de tamaño adecuado. Se concentró el filtrado hasta sequedad y se redisolvió en metanol. Se filtró la solución a través de un filtro de 0,45 µm y se recogió el filtrado en un recipiente ámbar.

Síntesis de RAD 822: inmunógeno BSA (Fig. 6)

Se añadió lentamente una solución en DMSO (6,8 ml) de RAD 822 (27,2 mg) en un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación magnética recubierta con teflón a una solución de BSA: PBS (10 ml, PBS 20 mM, pH 7,2) en condiciones de agitación vigorosa a temperatura ambiente. La solución empezó a volverse turbia gradualmente. Se cubrió el matraz de fondo redondo con lámina de aluminio y se dejó agitar durante otras 2 horas a temperatura ambiente, se dializó entonces en un tubo de diálisis SnakeSkin (Pierce) frente a tampón PBS 50 mM a pH 7,5 en sala fría cinco veces. El volumen final era de 45 ml. Se concentró la solución a 9 ml (~8 mg/ml) usando un concentrador Amicon Centriprep (Lote 874710, 10 kDa de MWCO). Se mezcló bien la solución para asegurar la homogeneidad.

Síntesis de everolimús-O-carboximetil-32-oxima (Fig. 7)

Se añadieron 160 mg de hemiclóridato de carboximetoxilamina a una solución de 290 mg de everolimús en 3,0 ml de piridina fría a +23°C. Se realizó la reacción en atmósfera inerte en un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación. Después de agitar la solución de reacción durante 5-6 horas, se diluyó el contenido con ~25 ml de cloruro de metileno y se extrajo sucesivamente con volúmenes iguales de HCl 1,2 M frío, bicarbonato de sodio saturado y cloruro de sodio saturado. Se secó la fase orgánica resultante con sulfato de sodio anhidro, se concentró a vacío y se usó en la siguiente etapa de activación como tal.

El análisis de HPLC en la fase estacionaria "Silica" (de Regis Technologies) usando 4% de metanol y 40% de acetato de etileno en hexano como fase móvil a 2 ml/min (detección UV a 280 nm) indica que la reacción conduce a la formación de isómeros (E y Z) y que la relación es 3:1 (suponiendo coeficientes de extinción similares). Masa molecular exacta: 1030,6. EM-IEP (M+Na⁺): 1052,8.

Síntesis de un éster activado (succinimida) de everolimús-O-carboximetil-32-oxima (Fig. 8)

Se mezclaron conjuntamente 7 mg de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) seca, 124 mg de dicitlohexilcarbodiimida (DCC), 173 mg de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y 309 mg de everolimús-O-carboximetil-27-oxima (de la etapa anterior), se disolvieron en cloruro de metileno seco y se enfrió a 0°C. Después de agitar durante aproximadamente 6 horas bajo atmósfera inerte, se filtró la suspensión resultante y se extrajo consecutivamente con HCl 1,2 M, bicarbonato de sodio saturado y cloruro de sodio saturado. Se secó la fase orgánica resultante con sulfato de sodio anhidro y se sometió a cromatografía en gel de sílice usando sucesivamente las siguientes mezclas de disolventes: hexano/acetona (3/2), hexano/acetona (1/1), hexano/acetona (2/3), todas v/v. Se combinaron las fracciones que contienen producto mayoritarias y se concentraron a vacío, proporcionando 116 mg del éster activado.

El análisis de HPLC en la fase estacionaria "Silica" (de Regis Technologies) usando 4% de metanol y 40% de acetato de etilo en hexano como fase móvil a 2 ml/min (detección UV a 280 nm) indica que la reacción conduce a la formación de isómeros E y Z (sin resolución del valor de referencia). Cromatografía de capa fina en mezcla de acetona/hexano (3/2, v/v): R_f = 0,48. Masa molecular exacta: 1127,6. EM-IEP (M+Na⁺): 1150,6.

Se muestra el compuesto resultante en la Fig. 8. Se entiende que el grupo succinimida puede reemplazarse por un inmunógeno de forma similar al proceso descrito anteriormente con RAD 822 para obtener RAD 822:BSA, o el grupo

succinimida puede reemplazarse por un marcador, de forma similar al proceso descrito anteriormente con RAD 822, para obtener RAD 822:FAMCO- E. Se entiende que pueden usarse otros inmunógenos, marcadores y trazadores.

EJEMPLO II (comparativo) – Preparación de anticuerpo

5 Pueden prepararse anticuerpos policlonales anti-everolimús mediante procedimientos convencionales. Se inmunizaron animales con el inmunógeno everolimús (RAD 822/BSA), como se produce en el Ejemplo 1. El programa de inmunización empezaba con una inyección inicial de 0,5 ml de mezcla de inmunógeno con 0,5 de coadyuvante completo de Freund. Se efectuaron inyecciones posteriores con 0,5 ml de mezcla de inmunógeno con 0,5 de coadyuvante incompleto de Freund. Se inyectaron típicamente los animales cada dos semanas. Se cribaron los sueros por FPIA usando RAD 822:trazador FAMCO-E. Se agruparon conjuntamente varias extracciones de sangre de producción bimensual (~20 ml por extracción) de tres conejos. Antes del filtrado y dilución, el volumen agrupado total es de aproximadamente 500 ml. Se filtraron los antisueros de conejo por filtro de acetato de celulosa de 0,2 µm a vacío y se diluyeron con tampón fosfato con azida de sodio y cloruro de sodio a pH 7,5. El volumen final es de aproximadamente 1000 ml.

15 Los anticuerpos monoclonales anti-everolimús pueden prepararse mediante la inmunización de ratones. Puede inyectarse a un ratón una composición que contiene un inmunógeno de esta invención y coadyuvante de Freund. Después de la última inmunización, se sacrificó el ratón y se procesó el bazo. Se fusionaron las células de bazo con células de mieloma. Se dejaron crecer las células fusionadas y se cribó el sobrenadante por ELISA.

EJEMPLO III (comparativo): Inmunoensayo de polarización de fluorescencia que usa RAD 822: trazador FAMCO-E

Inmunoensayo de polarización de fluorescencia automatizado (FPIA)

20 Este ejemplo describe un inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) ejemplar para everolimús.

Se efectuó el inmunoensayo de polarización de fluorescencia usando un analizador de polarización TDx automatizado (Abbott Laboratories, Irving, TX) que usa un ensayo competitivo que incluía un anticuerpo anti-analito (el anticuerpo anti-everolimús del ejemplo II) o "A", un conjugado de fluoresceína-análogo de everolimús (trazador o "T") y un tampón de pretratamiento o "B". Se consiguió la calibración del ensayo automatizado descrito en los ejemplos con una serie de seis patrones que incluyen suero humano enriquecido con concentraciones específicas de everolimús. Se disponen las muestras de pacientes (plasma) en recipientes de plástico de muestra en un carrusel circular diseñado para el instrumento TDx. Se describe el ensayo automatizado con detalle en la bibliografía disponible de Abbott Laboratories, Irving, TX. Se entiende que, aunque se usa el analizador de polarización TDx en este ejemplo, pueden usarse otros dispositivos para detectar la polarización en un FPIA.

30 Recogida de especímenes y preparación para análisis

Este ensayo se ha caracterizado solo para muestras de concentración mínima.

Se usa sangre completa tratada con EDTA para cada ensayo. Cada ensayo usa 600 µl de sangre completa, recogida usando la técnica de venopunción aséptica normal en tubos de vidrio o plástico con EDTA. Ilustrativamente, las muestras de pacientes pueden almacenarse a 2-8°C durante hasta 24 horas. Si se requiere un almacenamiento más largo, la sangre completa puede congelarse a -20°C o más frío y puede ensayarse hasta 28 días después. Ilustrativamente, se descongelan completamente las muestras congeladas y se mezclan concienzudamente antes del uso. Se mezclan concienzudamente todas las muestras (congeladas y frescas) invirtiendo suavemente múltiples veces antes de efectuar la extracción de muestra.

Reactivos

40 Reactivo anticuerpo (5 ml)- <5% de antisueros de conejo en tampón que contiene proteína como estabilizante y <0,1% de azida de sodio como conservante. Se produjo el reactivo anticuerpo policlonal en procedimientos coherentes con el ejemplo II, usando el inmunógeno mostrado en la Fig. 6 (RAD 822:BSA).

45 Reactivo trazador (5 ml)- <1% de trazador de fluoresceína (RAD 822: FAMCO-E FP, como se muestra en la Fig. 5) en tampón que contiene PBS 0,01 M, pH 7,5, 0,1% de azida de sodio y gamma-globulina bovina 0,01 mg/ml. Tapa de vial marcada con "T".

Tampón de pretratamiento (5 ml)- tampón tris, detergente y <0,1% de azida de sodio como conservante. Tapa de vial marcada con "B".

Reactivo de precipitación (7,5 ml)- contiene reactivo precipitante y <0,1% de azida de sodio.

Procedimiento de ensayo

50 A. Procedimiento de extracción de muestra:

Se extraen muestras (patrones, muestras de pacientes y controles) justo antes del análisis por el instrumento. Se pipetea 600 µl de cada patrón, control o muestra para ensayar en el tubo de centrifuga apropiado. Se dispensan 700 µl de metanol a la muestra y se añaden 100 µl de reactivo de precipitación a cada tubo de centrifuga que contiene muestra y metanol. Se tapa inmediatamente cada tubo de centrifuga para evitar la evaporación, se mezcla/somete a vórtex entonces vigorosamente a la velocidad máxima durante al menos 10 segundos y se centrifuga durante al menos 8 minutos a 13.400 x g. Después de centrifugar, se pipetea al menos 300 µl de cada sobrenadante a cartuchos de muestra cargados en el carrusel y se activa inmediatamente el instrumento para minimizar la evaporación de muestra.

B. Sumario del procedimiento:

10 Se disponen en un carrusel de ensayo dos cartuchos y dos cubetas por cada muestra de paciente y control. Se pipetea al menos 300 µl de sobrenadante del procedimiento de extracción de muestra en cada pocillo de muestra, evitando las burbujas. Se mezclan los reactivos por inversión suave. Se retiran los tapones del vial, se disponen el conjunto de reactivos y carrusel de ensayo en el analizador y se activa el proceso de ensayo sin demora.

15 El material de referencia usado se preparó mediante adición gravimétrica a sangre humana hemolizada. A cada lote de patrón se le asigna un valor en el TDx[®] usando un material de referencia que sea trazable con un procedimiento de CL/EM validado. Como se configura actualmente, se imprime el valor asignado de concentración de cada nivel de patrón en la etiqueta de cartón del patrón y la tarjeta de valor de patrón adjunta. Estos valores se programan en los parámetros de TDx[®] con cada nuevo lote de patrón. El intervalo de ensayo es de 2,00 ng/ml al valor asignado al patrón F (~40 ng/ml).

20 Resultados

El sistema de ensayo ilustrativo es un procedimiento cuantitativo. Se registran las concentraciones de everolimús en la impresión del analizador TDx[®]/TDxFix[®] en ng/ml. Los resultados de muestra de paciente menores que la sensibilidad del ensayo deberían reseñarse como “<2,00 ng/ml”. La concentración de everolimús en la mayoría de muestras entrará dentro del intervalo de ensayo. Si el valor de una muestra de paciente es mayor que el patrón F, se imprimirá “HI”. Ilustrativamente, dichas muestras pueden diluirse manualmente (1:1 o 1:4) con sangre completa negativa de everolimús, volverse a ensayar efectuando el procedimiento de extracción de muestra y multiplicarse el valor impreso final por el factor de dilución para obtener la concentración verdadera.

30 Se prefiere que los patrones, controles y muestras se procesen duplicadamente dos o más veces y se reseñe el valor medio. Se prefiere repetir los resultados con un coeficiente de variación (CV) de las duplicaciones mayor del 20%.

La mayoría del extracto de muestra es metanol. Debido a la volatilidad del metanol, el tiempo entre la extracción y el análisis de muestra se ha limitado para evitar la evaporación. La evaporación de las muestras puede conducir a resultados falsamente elevados. Por consiguiente, si las muestras se cargan en el instrumento y se anula el proceso, estas muestras deben volverse a extraer y procesar.

35 C. Características de rendimiento de FPIA que usa reactivo anticuerpo policlonal (RAD 822:BSA) y reactivo trazador (RAD 822:FAMCO-E)

1. Recuperación de muestras enriquecidas

40 Se enriquecieron especímenes de sangre completa negativos de everolimús con everolimús en el intervalo de ensayo y se ensayaron entonces n=3 en tres analizadores diferentes. Se comparó el valor medio con el valor de CL/EM y se calculó el porcentaje de recuperación. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1: Porcentaje de recuperación = media del resultado de TDx / resultado de CL/EM x 100%

TDx Resultado medio de TDx (ng/ml)	CL/EM Resultado medio de CL/EM (ng/ml)	Porcentaje de recuperación
32,07	39,53	81%
22,32	28,46	78%
14,52	17,39	83%
7,27	9,49	77%
3,63	4,74	77%

2. Correlación de la muestra de paciente con el procedimiento de referencia

5 Se compararon las concentraciones medidas mediante el sistema de ensayo ilustrativo TDx[®] con las medidas por CL/EM en muestras de sangre completa de pacientes que recibieron terapia de everolímús. Se muestran en la Fig. 10 los resultados de los ensayos de dos laboratorios de referencia para pacientes de trasplante de riñón (datos analizados usando el análisis de regresión lineal Passing Bablock), comparando el sistema de ensayo ilustrativo frente a CL/EM. Las muestras de TDx estaban en el intervalo de 2,40 ng/ml a 33,17 ng/ml y son de 110 pacientes individuales. De forma similar, se muestran en la Fig. 11 los resultados del ensayo de dos laboratorios de referencia para pacientes de trasplante de corazón (datos analizados usando el análisis de regresión lineal Passing Bablock), comparando el sistema de ensayo ilustrativo frente a CL/EM. Las muestras en TDx estaban en el intervalo de 2,06 ng/ml a 20,60 ng/ml y son de 62 pacientes individuales diferentes. El sistema de ensayo ilustrativo muestra una
10 relación lineal entre el porcentaje de dilución y la recuperación en el intervalo de ensayo.

Se evaluó la precisión del sistema de ensayo ilustrativo según las directrices del NCCLS. Se efectuaron estudios ensayando cada muestra por duplicado, dos veces al día durante 20 días no consecutivos en un solo analizador, y calibrando según fuera necesario. Se muestran los resultados a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Estudio de precisión

	<u>Nivel 1</u>	<u>Nivel 2</u>	<u>Nivel 3</u>
Media (ng/ml)	3,28	12,38	36,55
DE en la pasada (ng/ml)	0,35	0,73	3,13
CV en la pasada (%)	11%	6%	9%
DE de día a día (ng/ml)	0,39	0,63	1,85
CV de día a día (%)	12%	5%	5%
DE de pasada a pasada (ng/ml)	0,35	0,66	1,74
CV de pasada a pasada (%)	11%	5%	5%
DE total (ng/ml)	0,63	1,17	4,03
CV total (%)	19%	9%	11%

15

3. Especificidad. Reactividad cruzada.

Se realizaron estudios para examinar la reactividad cruzada del reactivo anticuerpo "A" con los principales metabolitos de everolímús. Se añadieron los compuestos (en la Tabla 3 siguiente) a 5 ng/ml a sangre completa humana agrupada normal (que contiene enriquecimiento con everolímús en el extremo inferior del intervalo terapéutico, aproximadamente a 4 ng/ml) y se ensayaron en el sistema de ensayo ilustrativo. Se ensayó sangre completa humana normal con enriquecimiento con everolímús como control.
20

Aunque se ensayaron a 5 ng/ml, se esperarían concentraciones de metabolito menores en los pacientes reales con terapia de everolímús. Se han encontrado RAD SA, RAD y PSA en cantidades <20% del fármaco original en estudios del metabolismo farmacológico de sujetos humanos. La reactividad cruzada de los metabolitos hidroxil-
25 (24/25 OH RAD, 46 OH RAD) no se ensayó por adición por enriquecimiento.

Tabla 3. Reactividad cruzada: % de reactividad cruzada = $\frac{[(\text{everolímús medido con metabolito enriquecido}) - (\text{control medido})]}{[\text{metabolito añadido}]} \times 100$

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración</u>	<u>Concentración</u>	<u>% de reactividad</u>
<u>ensayado</u>	<u>ensayada (ng/ml)</u>	<u>aparente (ng/ml)</u>	<u>cruzada</u>
RAD SA	5	0,26	5
RAD PSA	5	0,62	12

4. Especificidad. Interferencia de fármaco

30 Se ensayó el sistema de ensayo ilustrativo frente a compuestos potencialmente interferentes. Las sustancias mostradas en la Tabla 4, cuando se añaden a sangre completa humana (que contiene everolímús 12 ng/ml), tenían una reactividad cruzada menor del 5% cuando se ensayaban a concentraciones superiores a los niveles clínicamente relevantes.

Tabla 4: Interferencia de fármacos

<u>Fármaco</u>	<u>Nivel de ensayo (µg/ml)</u>
Acetaminofeno	200
N-acetilprocainamida	120
Aciclovir	1000
Albuterol	0,18
Alopurinol	60
Amikacina	150
Anfotericina B	100
Ácido ascórbico	30
Atenolol	40
Azatioprina	10
Cafeína	100
Captoprilo	50
Carbamezapina	120
Cefaclor	230
Cloranfenicol	250
Cimetidina	100
Ciprofloxacina	2500
Ciclosporina A	1
Digoxina	10
Diisopiramida	30
Eritromicina	200
Etanol	3500
Ácido fólico	0,01
Furosemida	100
Ganciclovir	1000
Gentamicina	20
Glipizida	60
Gliburida	40
Heparina	8000 U/l
Hidralazina	32
Hidroclorotiazida	40
Ibuprofeno	400
Insulina	400 µU/ml
Intralípido	15000
Isoniazida	70
Clorhidrato de isoproterenol	0,06
Kanamicina	100
Cetoconazol	10
Labetalol	200

Lidocaína	100
Lovastatina	4
HCl de metformina	5100
Metoclopramida	4
Misoprostol	0,015
Sulfato de morfina	6
Ácido micofenólico	250
Nadolol	333
Naproxeno	1000
Niacina	800
Nifedipina	120
Omeprazol	14
Penicilina G	100
Fenobarbital	150
Fenitoína	100
Piperacilina	8
Prazosina	25
Prednisona	12
Prednisolona	12
Primidona	100
Procainamida	25
Propranolol	0,5
Quinidina	100
Ranitidina	200
Rifampina	50
Ácido salicílico	500
Espectinomicina	100
Sulfametoxazol	400
Tacrolimús	0,5
Teofilina	250
Tobramicina	20
Triamtereno	600
Trimetoprim	20
Ácido valproico	1000
Vancomicina	630
Verapamilo	10

Especificidad. Sustancias interferentes

Se añadieron los siguientes compuestos, como se muestra en la Tabla 5, a sangre completa humana normal que contiene everolimús en o por debajo del extremo inferior del intervalo terapéutico, dando como resultado <10% de error en la cuantificación de everolimús por el sistema de ensayo ilustrativo.

5

Tabla 5: Sustancias interferentes

<u>Compuesto ensayado</u>	<u>Concentración ensayada</u>
Albúmina	12 g/dl
Bilirrubina	20 mg/dl
Colesterol	500 mg/dl
Gamma-globulina humana	12 g/dl
Factor reumatoide	500 UI/ml
Triglicéridos	1.500 mg /dl

Los hematocritos al 20% y 60% dieron como resultado $\leq 10\%$ de error en la cuantificación de everolimús mediante el sistema de ensayo ilustrativo.

5 5. Sensibilidad

El límite de cuantificación (LOQ) del sistema de ensayo ilustrativo, definido como la menor concentración en sangre humana completa en la que la CV interensayos entre duplicados múltiples es $\leq 20\%$, es de 2,00 ng/ml.

El límite inferior de detección (LDD) para el sistema de ensayo ilustrativo, definido como la menor concentración que puede distinguirse de cero, es 0,80 ng/ml.

10 Se entiende que los resultados anteriores son ilustrativos de FPIA que usa reactivo anticuerpo policlonal (RAD 822:BSA) y reactivo trazador (RAD 822:FAMCO-E). Otros ensayos competitivos dentro del alcance de esta invención pueden proporcionar características de rendimiento diferentes.

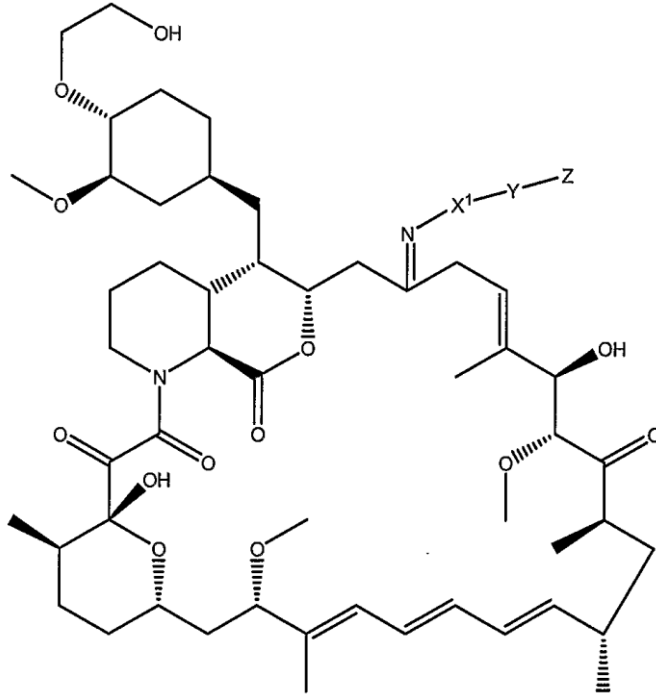
Aunque la invención se ha descrito con detalle con referencia a realizaciones preferidas, existen variaciones y modificaciones dentro del alcance de la invención como se describe y define en las siguientes reivindicaciones.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la concentración de everolímús en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 5 a) proporcionar un competidor marcado que comprende everolímús acoplado con un marcador detectable a través de un ligamiento oxima y que tiene la fórmula:



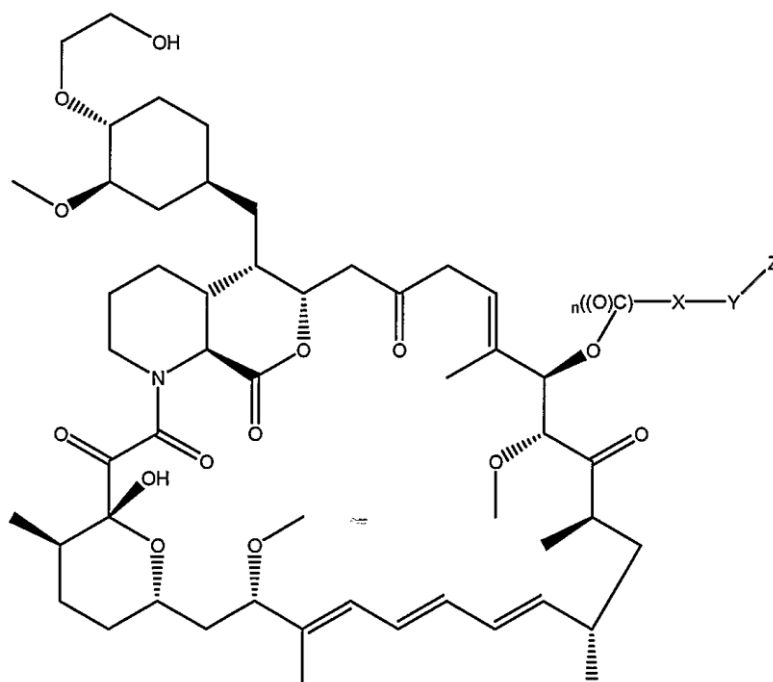
en la que

X¹ es una cadena ligadora que comprende uno o más átomos, cada uno de los cuales puede estar no sustituido o sustituido y puede ser ramificado o no ramificado;

- 10 Y se selecciona del grupo consistente en -C(O)-, -NH-, -S-, -CH₂- y -O-; y

Z es dicho marcador detectable;

- b) proporcionar un anticuerpo anti-everolímús producido usando un compuesto antigénico que comprende everolímús acoplado con un portador antigénico a través de un ligador y que tiene la fórmula:



en la que

n es 0 o 1;

5 X es una cadena ligadora que comprende 3-10 átomos de carbono o heteroátomos, en la que dicha cadena ligadora puede estar sustituida o no sustituida y puede ser lineal o ramificada;

Y se selecciona del grupo consistente en -C(O)-, -NH-, -S-, -CH₂- y -O-; y

Z es dicho portador antigénico;

10 c) combinar dicha muestra, dicho anticuerpo anti-everolímús y dicho competidor marcado, compitiendo el everolímús en dicha muestra con dicho competidor marcado por la unión a dicho anticuerpo anti-everolímús; y

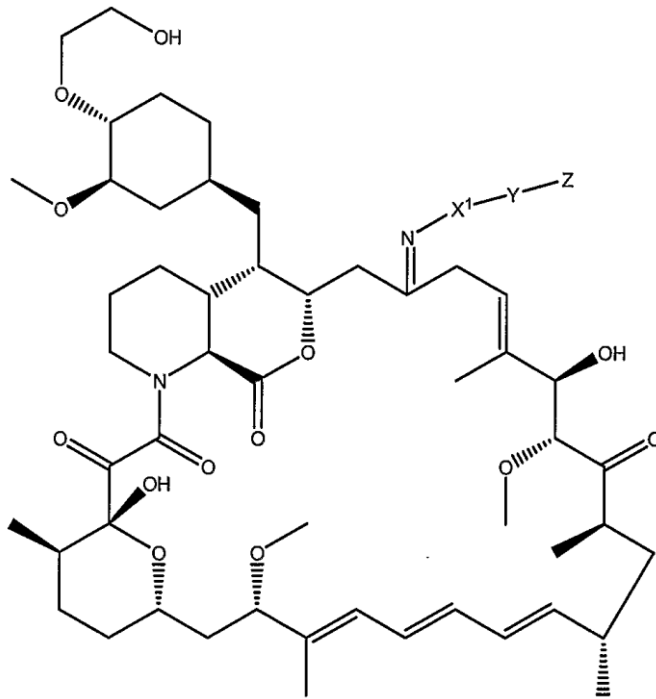
d) determinar la concentración de everolímús en dicha muestra midiendo la cantidad de dicho competidor marcado no unido a dicho anticuerpo mediante la detección de dicho marcador.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que X es -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- e Y es -C(O)-.

15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-everolímús tiene mayor afinidad por dicho everolímús en dicha muestra que por dicho competidor marcado.

20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (d) de determinación de la cantidad de dicho competidor marcado no unido a dicho anticuerpo anti-everolímús se efectúa mediante un ensayo automatizado seleccionado del grupo consistente en: FPAI, inmunoensayo de micropartículas homogéneas (inmunoturbidimétrico), inmunoensayo de donante de enzima clonada (CEDIA), inmunoensayo heterogéneo quimioluminiscente e inmunoensayo de flujo lateral.

5. Un kit para determinar la concentración de everolímús en una muestra, comprendiendo dicho kit: un competidor marcado que comprende everolímús acoplado con un marcador detectable a través de un ligamiento oxima y que tiene la fórmula:



en la que

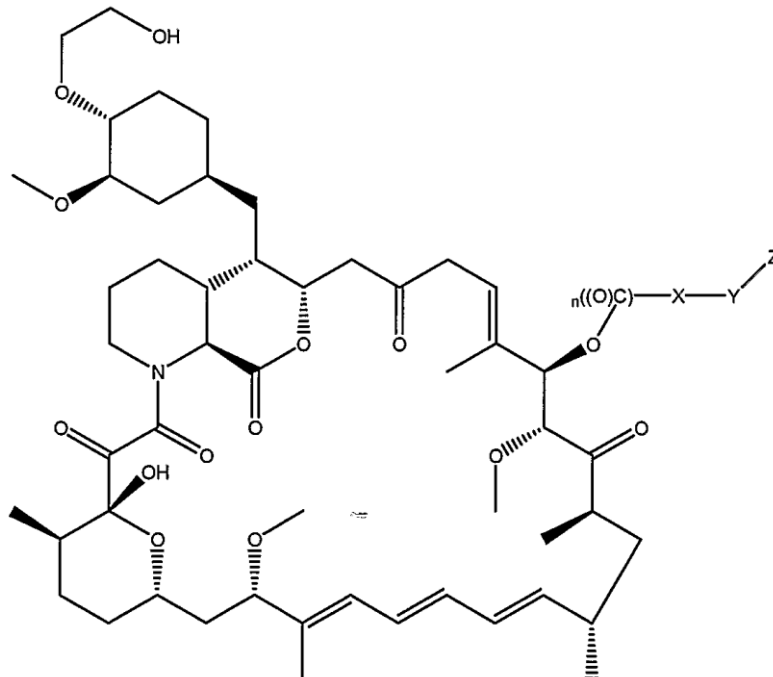
X¹ es una cadena ligadora que comprende uno o más átomos, cada uno de los cuales puede estar no sustituido o sustituido y puede ser ramificado o no ramificado;

5 Y se selecciona del grupo consistente en -C(O)-, -NH-, -S-, -CH₂- y -O-; y

Z es dicho marcador detectable; y

un anticuerpo anti-everolímús;

en el que dicho anticuerpo anti-everolímús se produce usando un compuesto antigénico que comprende everolímús acoplado con un portador antigénico a través de un ligador y que tiene la fórmula:



10

en la que

n es 0 o 1;

X es una cadena ligadora que comprende 3-10 átomos de carbono o heteroátomos, en la que dicha cadena ligadora puede estar sustituida o no sustituida y puede ser lineal o ramificada;

Y se selecciona del grupo consistente en -C(O)-, -NH-, -S-, -CH₂- y -O-; y

5 Z es dicho portador antigénico; y

en el que dicho competidor marcado compite con dicho everolimús en dicha muestra por la unión a dicho anticuerpo anti-everolimús.

6. El kit de la reivindicación 5, en el que X es -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- e Y es -C(O)-.

10 7. El kit de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo anti-everolimús tiene mayor afinidad por dicho everolimús en dicha muestra que por dicho competidor marcado.

8. El kit de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo anti-everolimús es un anticuerpo monoclonal.

9. El kit de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo anti-everolimús es un anticuerpo policlonal.

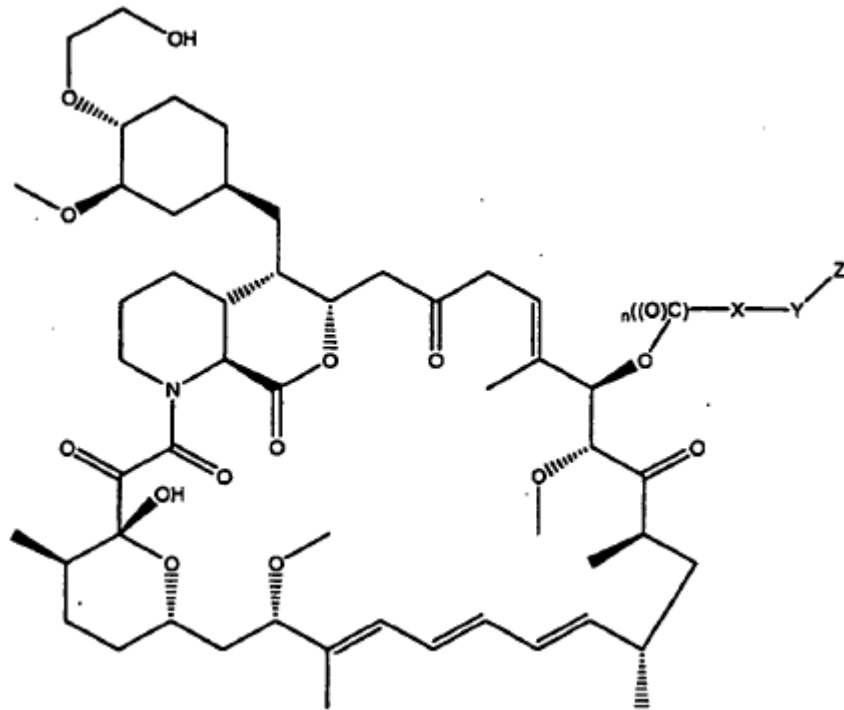


Figura 1

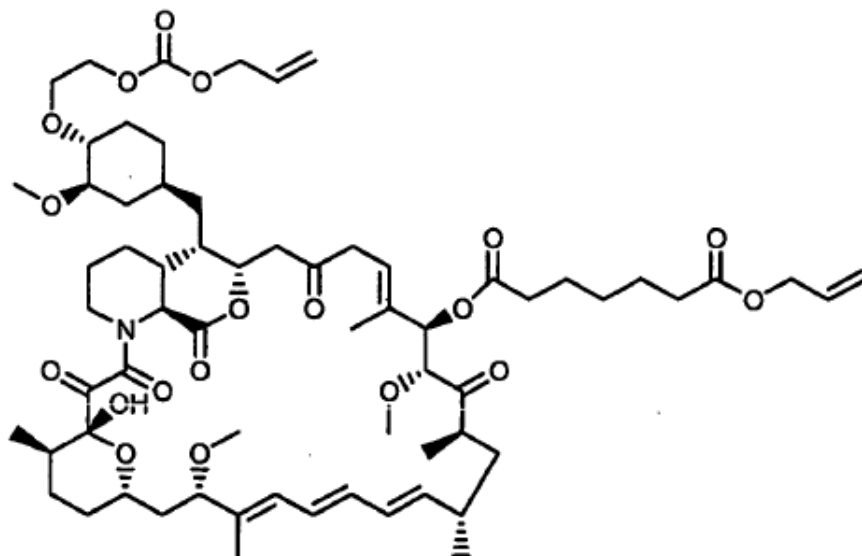
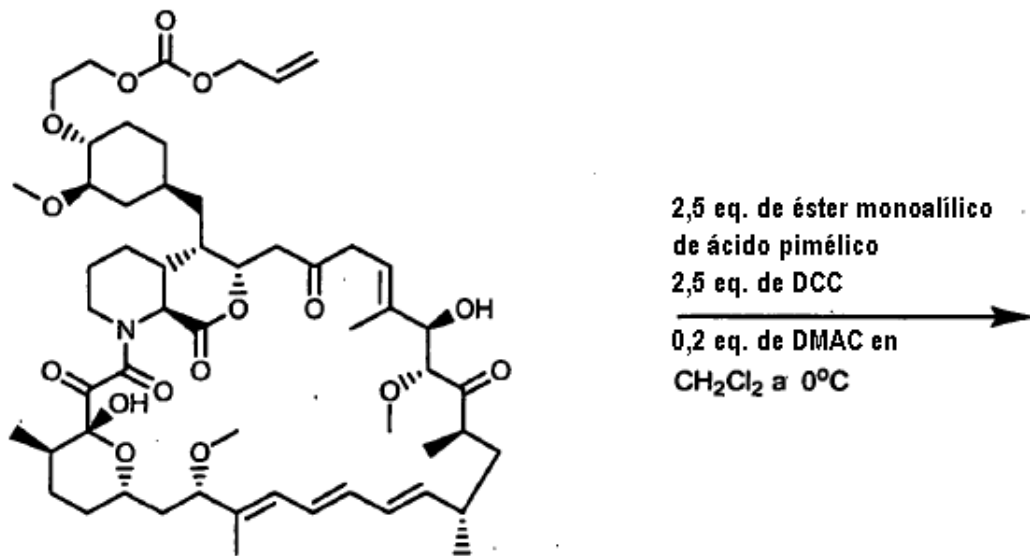


Figura 2

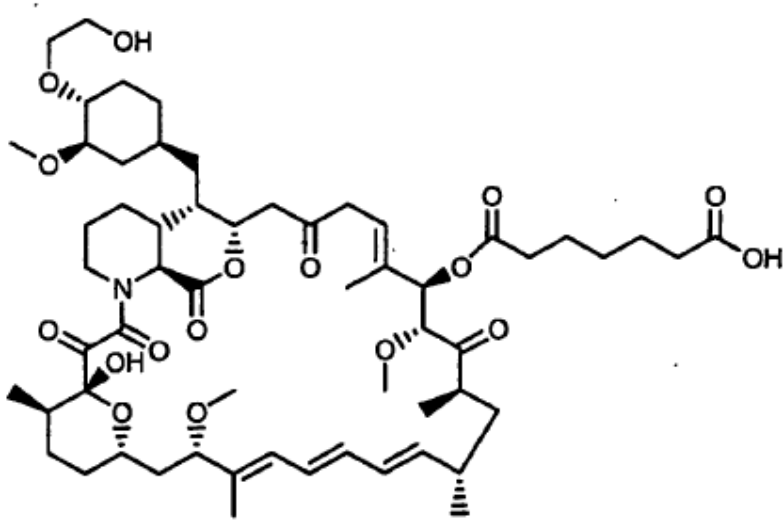
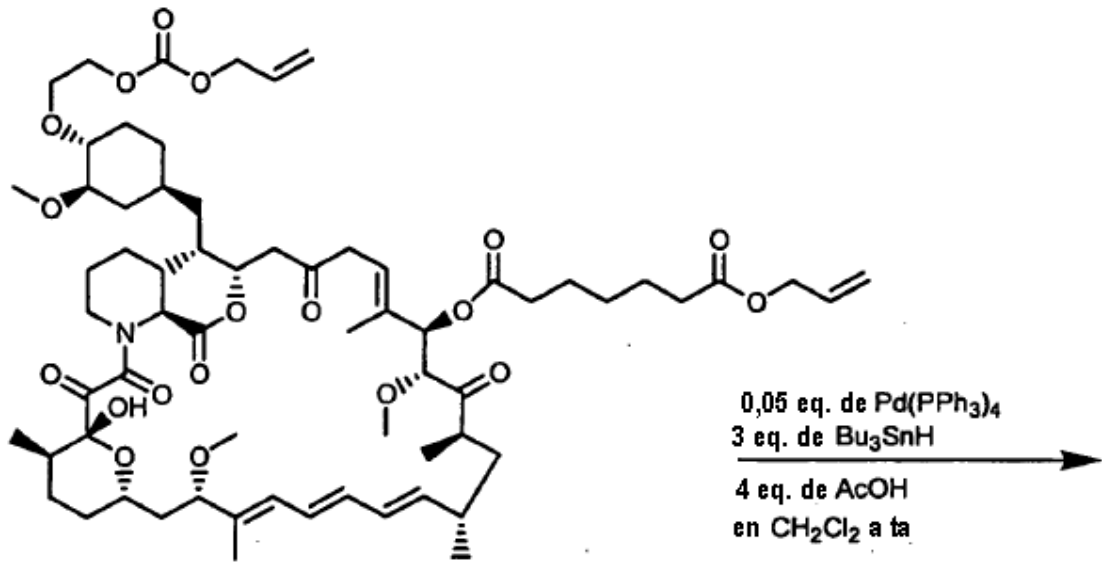


Figura 3

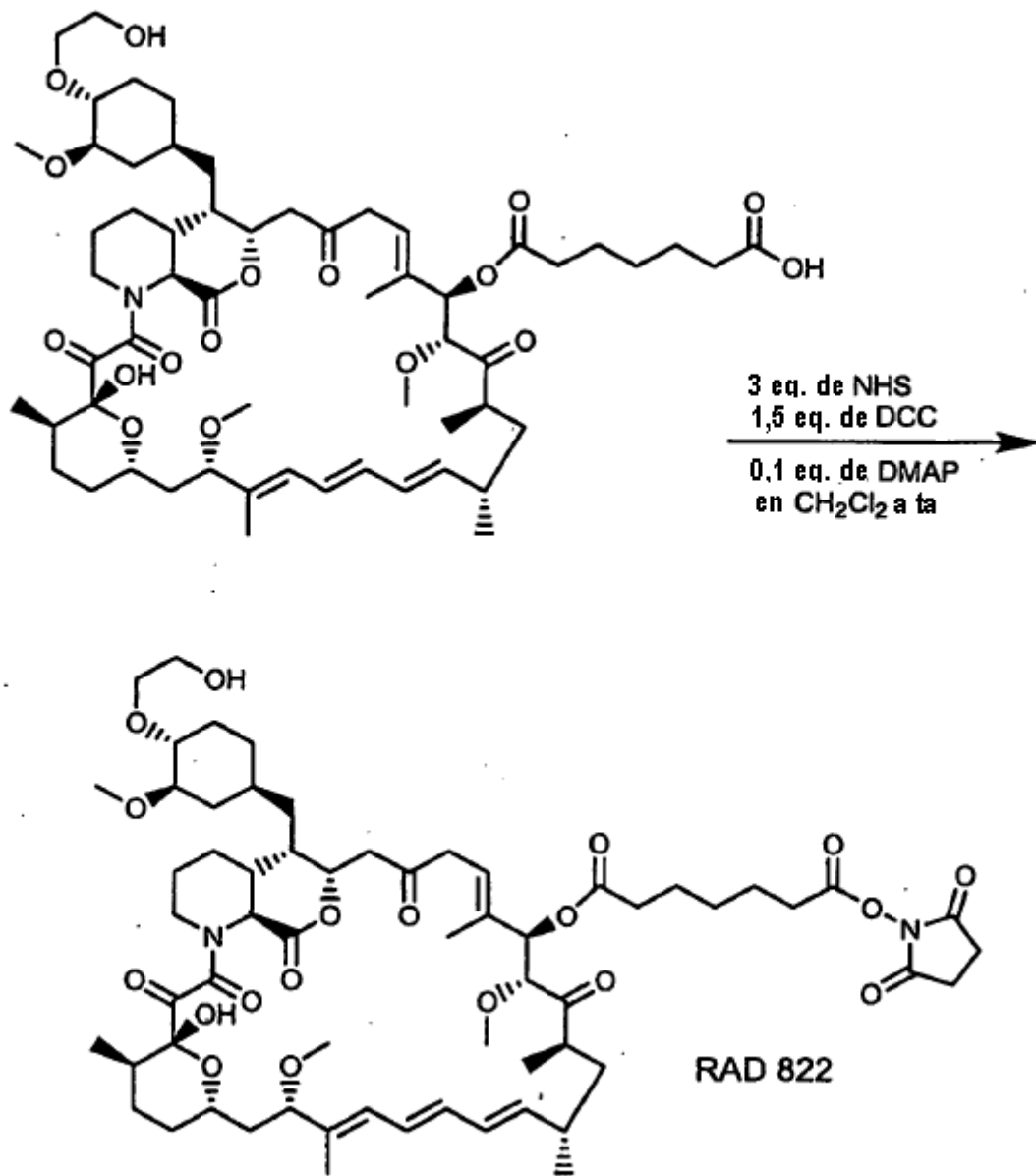


Figura 4

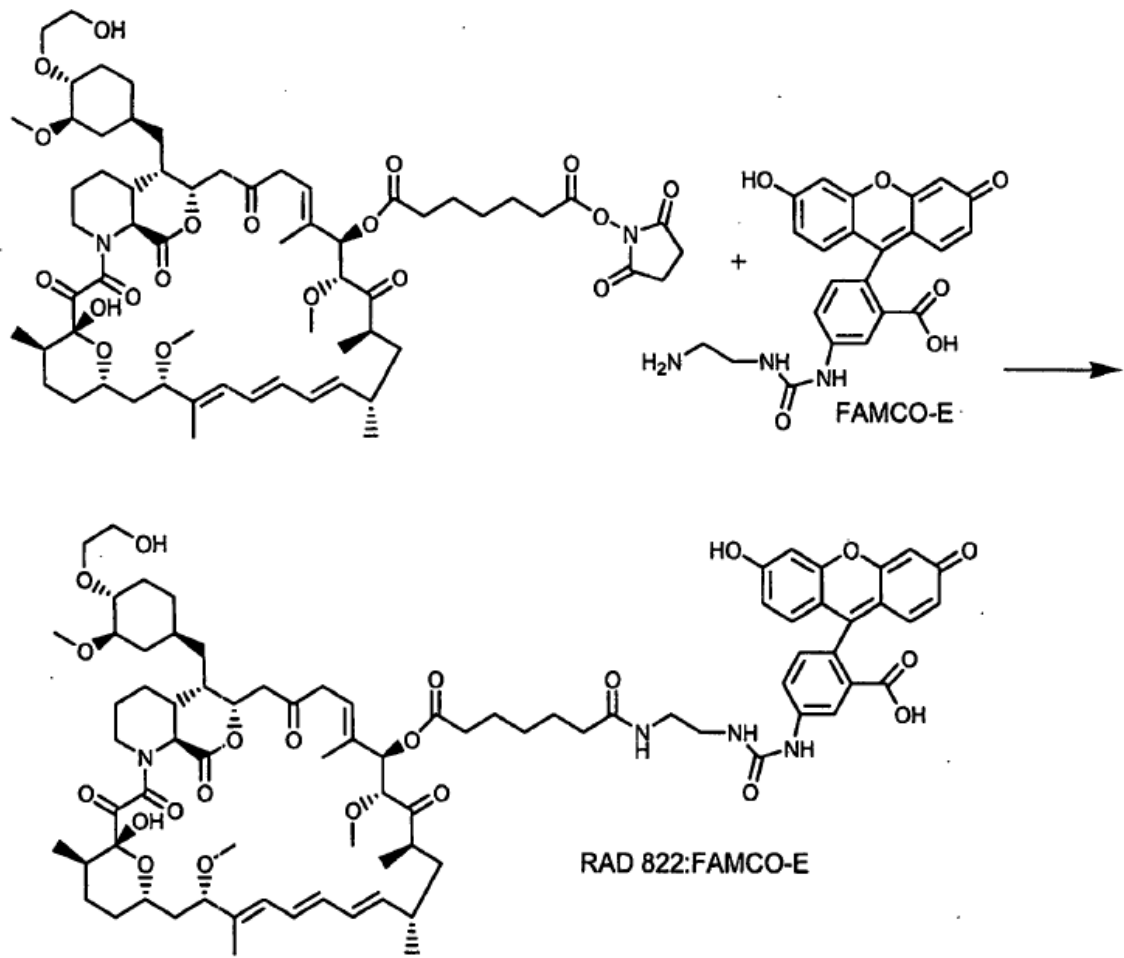


Figura 5

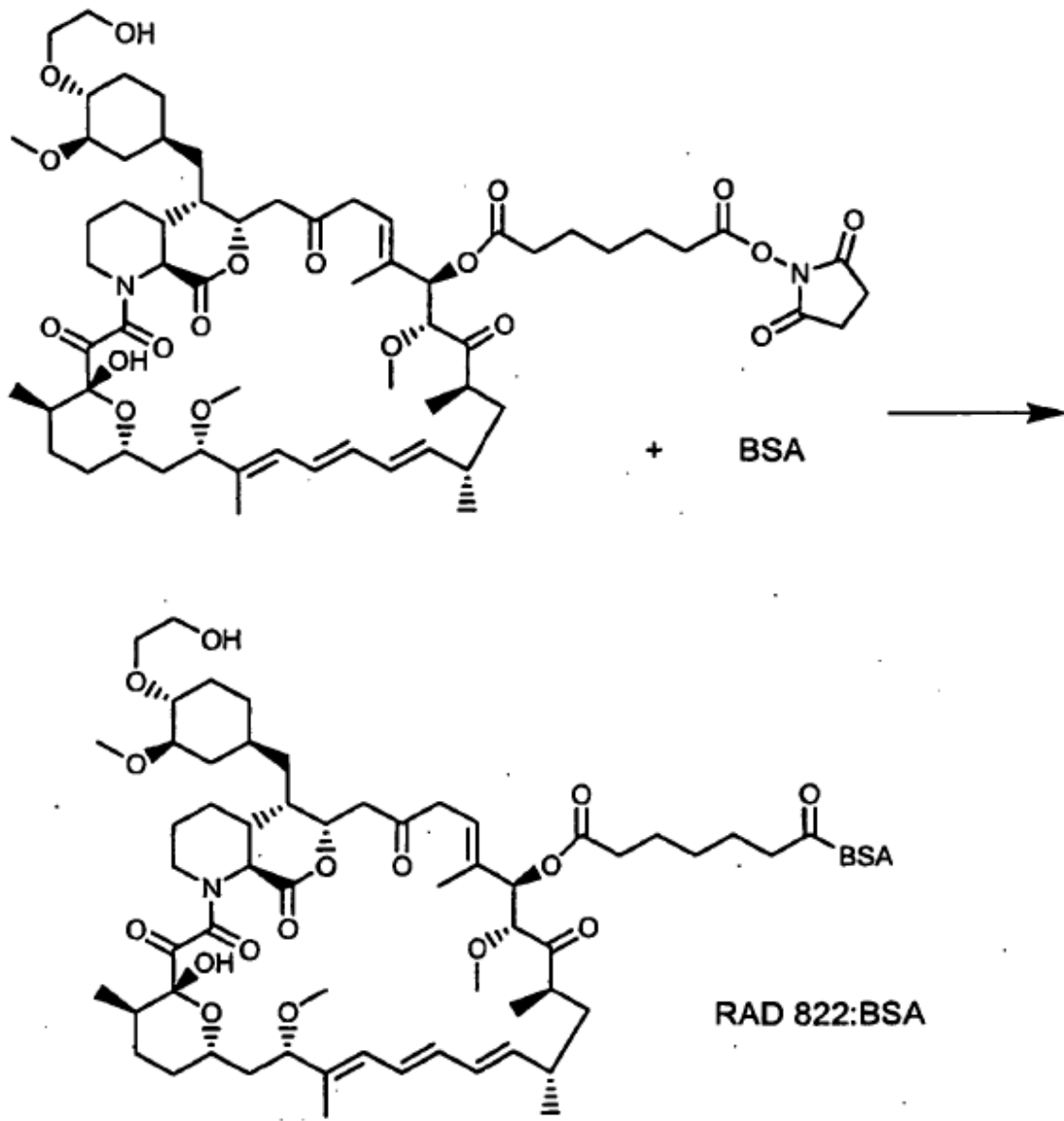


Figura 6

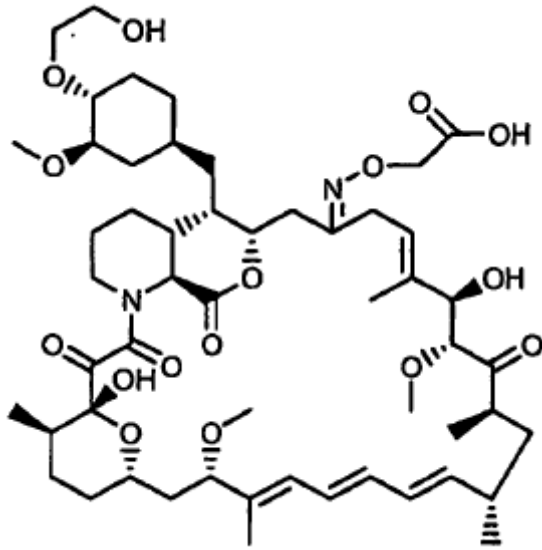


Figura 7

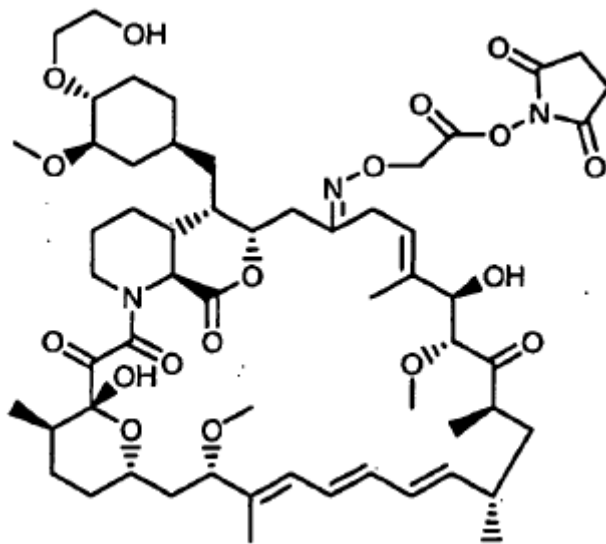


Figura 8

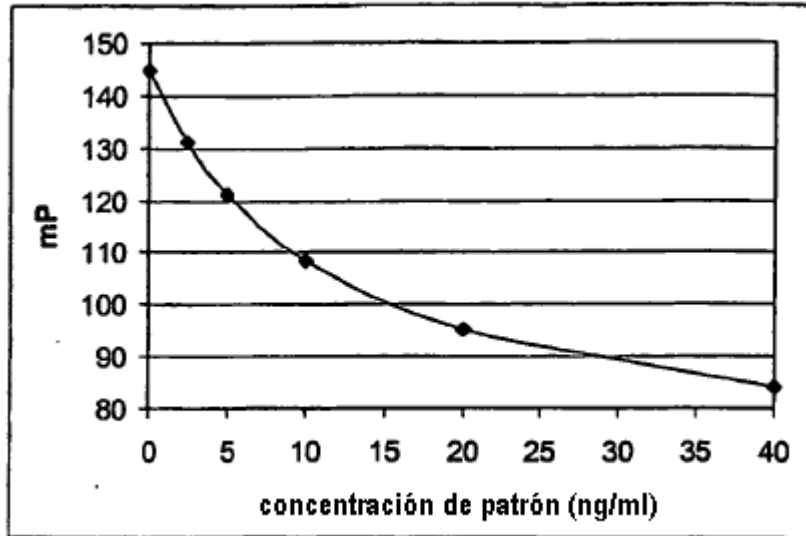


Figura 9

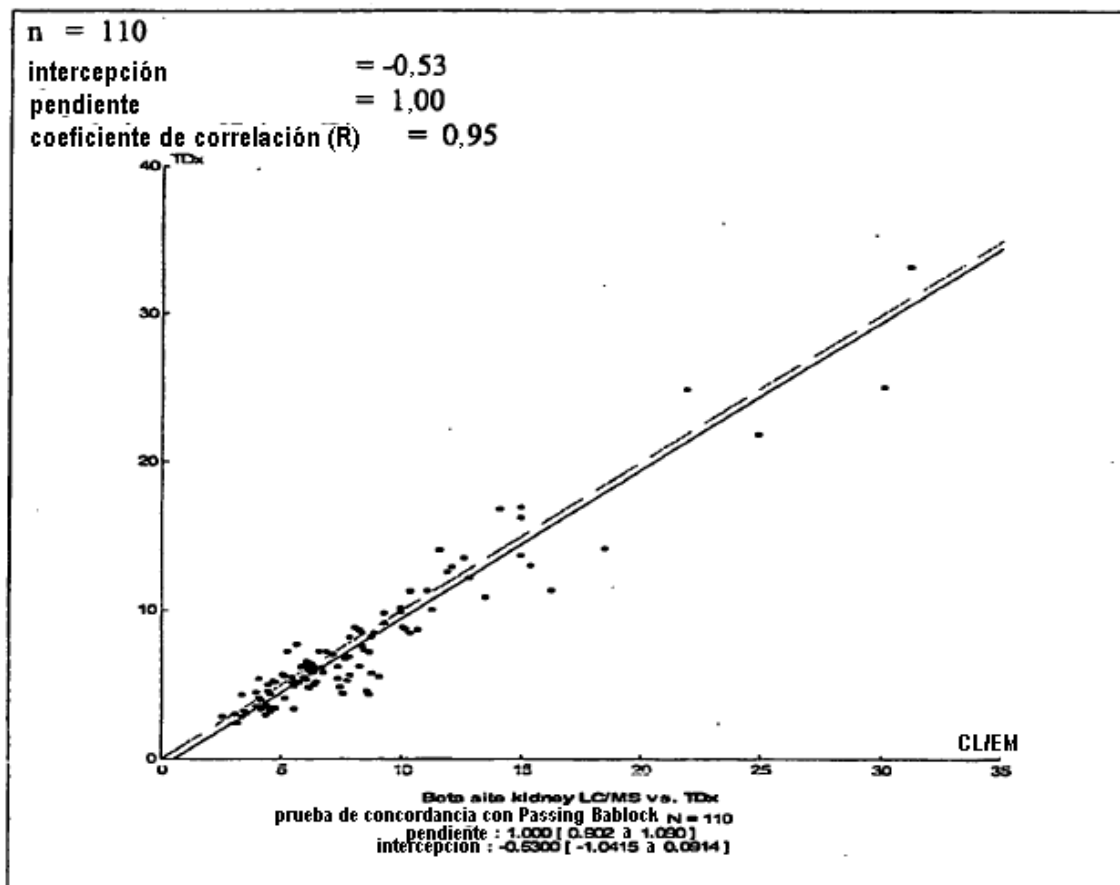


Figura 10

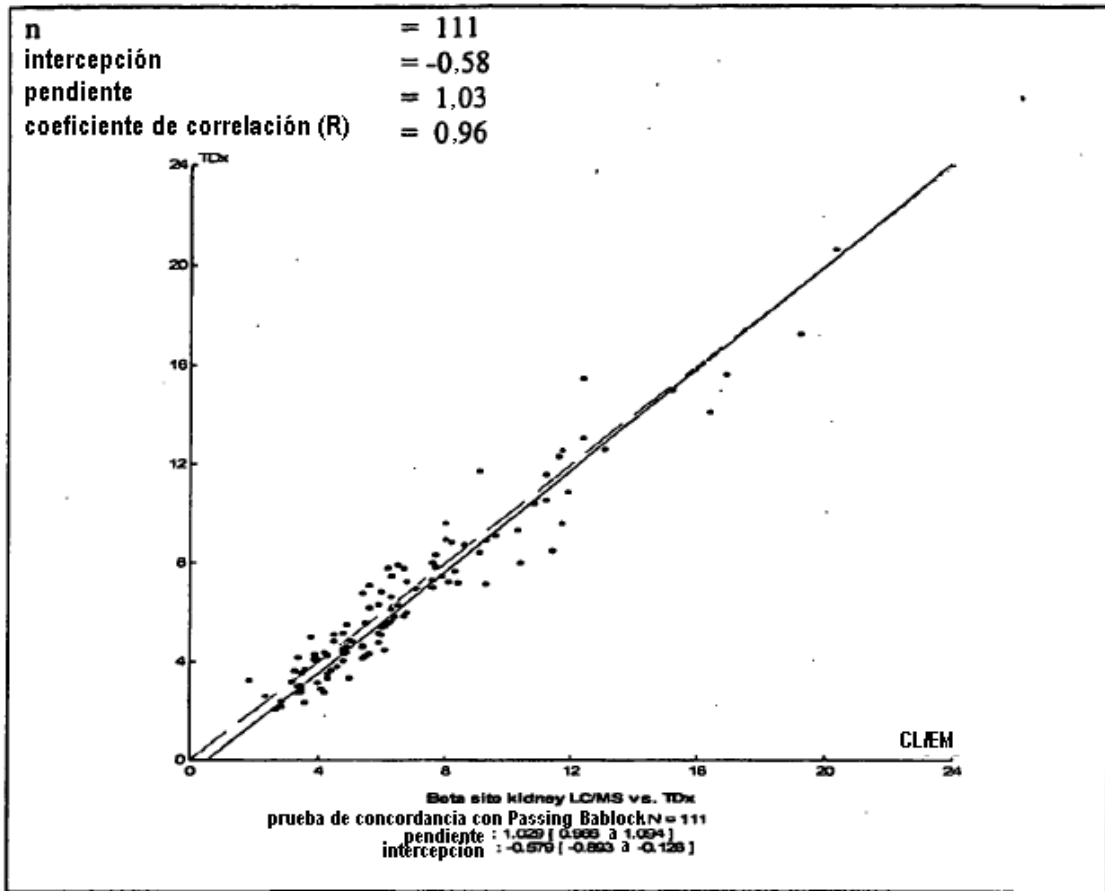


Figura 11

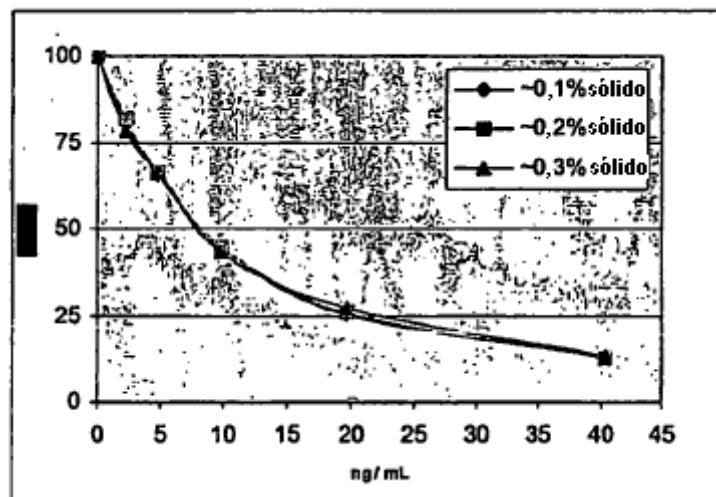


Figura 12