

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 290**

21 Número de solicitud: 201231836

51 Int. Cl.:

**C07D 311/56** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**27.11.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**30.06.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070816**

71 Solicitantes:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN  
RED EN BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y  
NANOMEDICINA (50.0%)  
Campus Río Ebro - Edificio I+D Pta 1ª, Bloq 5, C/  
Poeta Mariano Esquillor, s/n  
50018 Zaragoza ES y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SALVADOR VICO, Juan Pablo y  
MARCO COLÁS, M. Pilar**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **ANTICUERPOS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AGENTES  
ANTICOAGULANTES**

57 Resumen:

Anticuerpos para la detección y cuantificación de agentes anticoagulantes.

La presente invención se relaciona con el diseño de haptenos estructuralmente relacionados con compuestos anticoagulantes orales de tipo coumarínico (CAOC) con el objetivo de ser usados para la producción de anticuerpos específicos contra este tipo de sustancias y la posterior utilización de éstos para el desarrollo de herramientas de diagnóstico de uso en laboratorio o en dispositivos point-of-care (PoC). En particular, con los anticuerpos producidos se ha desarrollado una herramienta de diagnóstico que permite la cuantificación de los niveles plasmáticos de CAOC en pacientes tratados con este tipo de fármacos.

ES 2 472 290 A1

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para la detección y cuantificación de agentes anticoagulantes

### 5 **OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con compuestos, métodos y ensayos para la determinación de los niveles de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra biológica, así como con métodos, ensayos y kits para la determinación de la dosis adecuada de dichos agentes a administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los compuestos anticoagulantes de tipo cumarínico (CAC) son ampliamente utilizados en todos los países con el objetivo de prevenir o controlar ciertas cardiopatías. Así, la warfarina es empleada mayoritariamente en Norteamérica, Escandinavia y Reino Unido, mientras que el acenocumarol y el fenprocumón se emplean principalmente en Europa. Estos compuestos son antagonistas de la vitamina K que inhiben los factores de coagulación II (protrombina), VII, IX y X. Sin embargo, su estrecha ventana terapéutica sumada al hecho de que su efecto sea distinto según el genotipo del paciente, sus enfermedades u otros factores relacionados con el estilo de vida, plantean ciertas dificultades a la hora de fijar la dosis adecuada de dichos compuestos para cada paciente, resultando en un aumento de hemorragias (por exceso de dosis) o formación de trombos (por defecto de dosis). La dosis de anticoagulantes orales puede ir desde 0,75 mg/día a 12 mg/día en función del paciente y del tipo particular de anticoagulante.

Las técnicas analíticas que se emplean actualmente para determinar o para corregir la dosis de agente anticoagulante oral para un paciente comprenden la medida del tiempo de protrombina (PT) y correspondiente INR (*International Normalized Ratio*), de modo que tales parámetros determinan la tendencia de la sangre a coagular en presencia de posibles trastornos de la coagulación. El rango normal de PT varía entre 12 y 15 segundos y el de INR entre 0,8 y 1,2 (a mayor valor de INR, mayor tiempo necesario para la coagulación). Estudios en los que se evaluó el tratamiento a largo plazo de la trombosis venosa profunda (TVP) mostraron que las recurrencias se impiden por completo a valores de INR de entre 2,0 y 3,0, sin embargo se recomienda que el tratamiento anticoagulante de tipo cumarínico resulte en valores de INR por debajo de 2,0.

Los compuestos anticoagulantes se administran como mezclas racémicas que son rápidamente absorbidas por el tracto gastrointestinal, de modo que en pocas horas se tienen cantidades detectables en plasma de los anticoagulantes. Aunque hay biodisponibilidad de los dos enantiómeros, la forma R del enantiómero tiene una vida media superior a la forma S del enantiómero, que es más susceptible de ser metabolizado.

Se han descrito diferentes metodologías para la determinación de anticoagulantes en plasma y en orina. La mayoría de ellas se basan principalmente en técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas. El objetivo de estas técnicas es realizar un seguimiento de la concentración de anticoagulante de tipo cumarínico administrado y de sus metabolitos para confirmar la presencia del anticoagulante y establecer su farmacocinética. La técnica de HPLC-MS ha sido empleada en la determinación selectiva de warfarina (W), acenocumarol (ACL) y fenprocumón (PPC), con un límite de detección (LOD) de 0,5 ng/ml en la detección del anticoagulante parental y de sus metabolitos derivados (Vecchione G *et al.* 2007 J Chromatogr B 850:507; Rentsch KM *et al.* 2000 J Chromatogr B 742: 131). Asimismo, la tecnología basada en HPLC-espectrometría de masas de ionización por electrospray se ha empleado en la identificación y cuantificación de anticoagulantes tales como warfarina y acenocumarol en muestras de pacientes (Kollroser M & Schober C 2002 Clin Chem 48(1): 84-91). Sin embargo, estas técnicas requieren un pretratamiento y derivatización de las muestras de plasma o de orina a analizar, lo cual hace más lento el proceso.

Por otro lado, aunque los métodos inmunoquímicos son altamente específicos y sensibles y además ofrecen la posibilidad de diferentes formatos de ensayo, no son muy empleados en la determinación de anticoagulantes orales. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-warfarina así como un biosensor de resonancia de plasmón de superficie para la determinación de warfarina en plasma (Fitzpatrick B & O'Kennedy R 2004 J Immunol Methods 291: 11). El rango de precisión logrado mediante esta técnica es de 4-250 ng/ml, dentro del rango clínico. Sin embargo, no se ha mostrado su selectividad de detección de warfarina frente a otros metabolitos principales.

También se han descrito metodologías dirigidas a establecer una dosis adecuada de un tratamiento basado en un anticoagulante a administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento. La solicitud de patente internacional WO 2004/003550 está dirigida a métodos, entre otros, para la caracterización fenotípica metabólica de agentes anticoagulantes y para

la administración a un sujeto de una dosis segura de un agente anticoagulante, así como ensayos para la detección de metabolitos específicos de enzima en una muestra biológica. El documento de patente en Estados Unidos US 2010/0273203 está dirigido a métodos para la determinación de la dosis adecuada de warfarina para un sujeto, que comprende

5 determinar el perfil metabólico de warfarina del sujeto, comparar dicho perfil con una base de datos y seleccionar un perfil similar de la base de datos al perfil metabólico del sujeto, en donde la dosis del perfil de la base de datos es conocida.

En los pacientes en tratamiento con anticoagulantes de tipo cumarínico, pequeñas

10 variaciones en la dosis del medicamento pueden ocasionar grandes variaciones en su efecto. Es precisamente por este motivo, que se debe monitorizar periódicamente el efecto de los agentes anticoagulantes de tipo cumarínico mediante análisis. Cada paciente requiere una dosis individualizada y adecuada a sus necesidades, la cual debe ser previamente ajustada para mantener el tiempo de coagulación dentro del intervalo adecuado. Por otro

15 lado, el nivel de coagulación apropiado para cada paciente se determina según la enfermedad que padece. La monitorización y control del paciente bajo tratamiento con anticoagulantes de tipo cumarínico son especialmente críticos al inicio de dicho tratamiento. Efectos adversos derivados del tratamiento con anticoagulantes son las hemorragias leves, tales como pequeñas hemorragias (sangrado de las encías, nariz, etc.), menstruación más

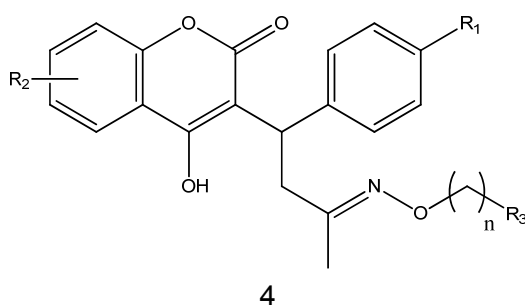
20 abundante de lo habitual, moratones o hematomas en la piel.

Por lo tanto, es necesario desarrollar metodologías alternativas a las descritas en la técnica para la detección específica y sensible de anticoagulantes de tipo cumarínico y de sus metabolitos en muestras tales como plasma y orina, así como metodologías que permitan

25 establecer un régimen de dosis adecuado para un paciente en necesidad de un tratamiento basado en anticoagulantes de tipo cumarínico.

### **COMPENDIO DE LA INVENCION**

30 En un primer aspecto, la invención se relaciona con un hapteno de fórmula (I):



(I)

donde

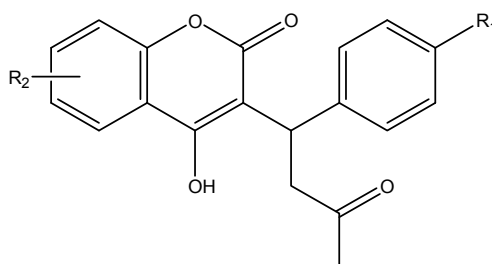
R<sub>1</sub> se selecciona de entre H, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, halógeno, OH, O-C<sub>1-4</sub> alquilo, NHCOCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub> y  
5 OCF<sub>3</sub>;

donde R<sub>2</sub> se selecciona de entre halógeno, OH, C<sub>1-4</sub> alquilo y O-C<sub>1-4</sub> alquilo;

donde n es un número entero entre 1 y 6.

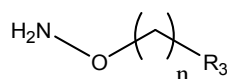
R<sub>3</sub> se selecciona de entre COOH, CHO, halógeno, NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, C≡CH, OH y SH.

- 10 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para la preparación de un hapteno de fórmula (I) que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II):



(II)

- 15 donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se definen como anteriormente;  
con un compuesto de fórmula (III):



(III)

- 20 donde n y R<sub>3</sub> se definen como anteriormente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y un segundo componente seleccionado del grupo formado por:

- (a) una proteína transportadora o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad,  
25 (b) un oligonucleótido,  
(c) una etiqueta detectable, y  
(d) un polímero o un soporte inorgánico.

- En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo que reconoce específicamente  
30 el conjugado anterior.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un antisuero que comprende el anticuerpo anterior.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del anticuerpo anterior o del antisuero anterior en la detección y/o cuantificación de anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto que comprende:

- (i) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo según la invención o con un antisuero según la invención, y
- (ii) 15 detectar la formación de complejos anticoagulante de tipo cumarínico-anticuerpo según la invención.

20 En un último aspecto, la invención se relaciona con un kit para la detección y o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en la muestra de un sujeto que comprende al menos al menos un anticuerpo según la invención, un antisuero que comprende un anticuerpo según la invención o un conjugado según la invención.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

25 La **Figura 1** muestra la curva de calibración para los inmunoensayos hACL-HRP/As236 y A2-BSA/As233, utilizando como calibradores el ACL y la W, respectivamente. Para la curva de calibración de estos anticoagulantes de tipo coumarínico fueron preparados en tampón PBST, tampón fosfato 0,010 M en una solución salina al 8% a pH 7,5 y Tween® 20 al 0,05%. Los datos muestran los promedios de tres ensayos realizados en diferentes días. Los datos mostrados son el promedio y desviación estándar de al menos dos pocillos replicados.

30 La **Figura 2** muestra curvas de calibración para el ensayo hACL-HRP/As236 (arriba) y A2-BSA/As233 (abajo) en plasma a diferentes factores de dilución (1/n, n=1, 2, 5, 10 y 25). La dilución se hace en PBST: tampón fosfato 0,010 M en una solución salina al 8% a pH 7,5 y Tween® 20 al 0,05%. Los datos mostrados son el promedio y desviación estándar de al menos dos pocillos replicados.

La **Figura 3** muestra curvas de calibración del ensayo hACL-HRP/As236 en PBST con un 10% de etanol y la curva del mismo ensayo con un extracto del plasma utilizando el EtOH como precipitación y diluido 10 veces en PBST.

La **Figura 4** muestra el estudio de exactitud realizado en PBST y en plasma. El gráfico muestra la correlación entre los valores de concentración de CAC medidos (eje de ordenadas) y fortificados (dopados) (eje de abscisas) en nM usando el formato ELISA para analizar las muestras de tampón PBST. La línea de puntos corresponde a una correlación perfecta (pendiente = 1). Los datos corresponden al promedio de al menos tres replicados.

La **Figura 5** muestra los resultados de pacientes control (arriba) y tratados con acenocoumarol (abajo). Los datos corresponden a una media de n=4, donde cada medida está realizada por triplicado.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Los autores de la presente invención han diseñado haptenos estructuralmente relacionados con anticoagulantes de tipo cumarínico (CAC) para la producción de anticuerpos específicos contra este tipo de compuestos. En particular, con los anticuerpos producidos se ha desarrollado una herramienta de diagnóstico que permite la cuantificación de los niveles plasmáticos de CAC en pacientes tratados con este tipo de fármacos.

La herramienta de diagnóstico desarrollada con estos anticuerpos específicos permite llevar a cabo de forma eficaz estudios farmacocinéticos en cada paciente, con la posibilidad de ajustar la dosis de forma personalizada. Además, esta herramienta, combinada con la medición del tiempo de protrombina, permite realizar un seguimiento mucho más completo del paciente y de su respuesta a la medicación.

La presente invención tiene su clave en el diseño y la síntesis de haptenos de inmunización, cuya estructura ha permitido la generación de estos anticuerpos específicos. Los inventores han determinado las estructuras y síntesis de dichos haptenos, bioconjugados hapteno-proteína, el procedimiento inmunoquímico de análisis y su evaluación con muestras de pacientes. Los anticuerpos y el ensayo correspondiente son válidos para su empleo en cualquier tipo de formato de inmunoensayo como por ejemplo en formato tipo ELISA, Western-blot, inmunoturbidimetría o inmunosensor.

*Definiciones*

El término “agente de entrecruzamiento” o “agente entrecruzante” o “agente de reticulación”, también conocido como cross-linker, hace referencia a un reactivo bifuncional que origina uniones intermoleculares de tipo covalente entre dos moléculas. Los agentes de entrecruzamiento comprenden grupos reactivos en los extremos que son específicos para determinados grupos funcionales. Los grupos reactivos de los agentes bifuncionales están separados entre sí por una cadena espaciadora (también denominada “brazo espaciador”) de una longitud determinada, la cual permite determinar la distancia a la que se encuentran los dos residuos que son entrecruzados. En una realización particular de la invención, las moléculas que contienen grupos reactivos susceptibles de conjugación mediante agentes de entrecruzamiento son proteínas y/o péptidos y haptenos.

Los agentes de entrecruzamiento pueden ser homobifuncionales o heterobifuncionales.

Los “agentes de entrecruzamiento homobifuncionales” son aquellos que comprenden grupos reactivos iguales en los extremos opuestos, separados entre sí por un brazo espaciador. Los agentes de entrecruzamiento homobifuncionales permiten que la reacción de entrecruzamiento transcurra en una sola etapa. Los agentes homobifuncionales incluyen, sin limitarse a, glutaraldehído, diaminoalcanos, di(N-succinimidil) carbonato, di(N-succinimidil) suberato, dimetil adipimato dihidrocloruro, dimetil pimelimidato dihidrocloruro, dimetil suberimidato dihidrocloruro, bis(sulfosuccinimidil)suberato (BSSS, BS3), disuccinimidil glutarato (DSG), etilen glicolbis(sulfosuccinimidilsuccinato) (sulfo-EGS), disuccinimidil suberato (DSS), dithiobis(succinimidil propionato) (DTSP, reactivo de Lomant), etilen glicolbis(succinimidilsuccinato) (EGS), bis(sulfosuccinimidil) glutarato (BS2G), 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), disuccinimidil tartrato (DST), (Bis(2-(succinimidooxycarbonilo)etil)sulfona (BSOCOES), 1,4-di-(3'-(2'piridilditio)-propionamido) butano (DPDPB), sulfodisuccinimidil tartrato (sulfo DST), ditiobis(succinimidil propionato) (DSP), etilenglicol bis(succinimidil succinato) (EGS).

Los “agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales” son aquellos que comprenden grupos reactivos diferentes en los extremos opuestos, separados entre sí por un brazo espaciador. El empleo de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales requiere que la reacción de entrecruzamiento transcurra en dos etapas secuenciales, de modo que en primer lugar se hace reaccionar el extremo reactivo menos lábil. Los agentes heterobifuncionales incluyen, sin limitarse a, succinimidil-4-[N-maleimidometil]cyclohexano-1-carboxilato (SMCC), SANPAH, n-sulfosuccinimidil-6-[4'-azido-2'-nitrofenilamino] hexanoato (sulfo-SANPAH), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), m-



maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida éster (sulfo MBS), N- $\alpha$ -maleimidobutiriloxisuccinimida éster (GMBS), N- $\gamma$ -maleimidobutiriloxisulfosuccinimida éster (sulfo GMBS), N-( $\epsilon$ -maleimidocaproico azido) hidrazida (EMCH), N-( $\epsilon$ -maleimidocaproiloxi) succinimida éster (EMCS), N-( $\epsilon$ -maleimidocaproiloxi) sulfo succinimida éster (sulfo EMCS),  
 5 N-( $p$ -maleimidofenil) isocianato (PMPI), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil 6-[3(2-piridilditio)propionamido] hexanoato (LC-SPDP), N-succinimidil bromoacetato (SBA), N-[ $\epsilon$ -maleimidocaproiloxi]succinimida éster (EMCS), succinimidil-6-[ $\beta$ -maleimidopropionamido]hexanoato (SMPH), sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]-  
 10 propionamido)hexanoate (sulfo-LC-SPDP), N-succinimidil 4-[4-maleimidofenil]butirato (SMPB), (3-[2-Piridilditio]propionil hidrazida) (PDPH), N-succinimidil iodoacetate (SIA), N-( $\beta$ -maleimidopropiloxi)succinimida éster (BMPS) y N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NOS), así como acoplamiento mediante diazonio, ciclo-adición alcalina de azida catalizada por cobre (CuAAC), ligación oxima/hidrazona y acoplamiento oxidativo a  $p$ -  
 15 aminofenilalanina.

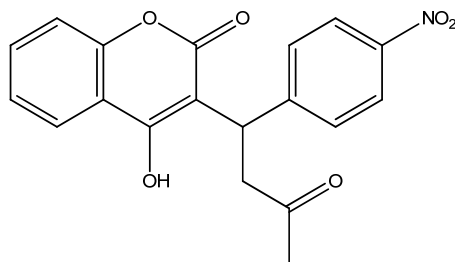
Si se atiende a los grupos funcionales que se unen, los agentes de entrecruzamiento incluyen, sin limitarse a, agentes de entrecruzamiento amino-a-amino, agentes de entrecruzamiento amino-a-sulfhidrilo, agentes de entrecruzamiento carboxilo-a-amino,  
 20 agentes de entrecruzamiento fotorreactivos, agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo-a-carbohidrato, agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo-a-hidroxilo y agentes de entrecruzamiento sulfhidrilo-a-sulfhidrilo.

El término "antígeno" hace referencia a una molécula, tal como un péptido, un hidrato de carbono, un glicolípido, una glicoproteína o una molécula pequeña que es reconocida y se une a un anticuerpo. La parte del antígeno que es la diana de la unión del anticuerpo corresponde al determinante antigénico. En el contexto de la presente invención, el antígeno hace referencia a un hapteno de acuerdo a la invención conjugado con una proteína portadora, siendo dicho conjugado el que es reconocido y se une a los anticuerpos  
 30 específicos contra agentes anticoagulantes de tipo cumarínico.

El término "antisuero" se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal. En el contexto de la presente  
 35 invención, el inmunógeno es un conjugado de acuerdo a la invención y el antisuero comprende anticuerpos específicos generados frente al conjugado de la invención.

El término “acenocumarol” (ACL) hace referencia a un agente anticoagulante, derivado de la cumarina, que actúa como antagonista de la vitamina K. Es comercializado con el nombre de Sintrom o Sinthrome®. Tiene como fórmula:

5



(IV)

El término “adyuvante” hace referencia a un compuesto, natural o sintético, que al ser  
 10 administrado junto con un inmunógeno, aumenta de forma no específica la intensidad de la  
 respuesta inmune generada frente a dicho inmunógeno. Los adyuvantes tienen cuatro  
 modos de acción principales: mejorar la captación y la localización de antígenos, liberación  
 de antígeno extendida, activación de macrófagos y estimulación de las células B y T. Los  
 adyuvantes más comúnmente utilizados se clasifican en seis categorías: sales minerales,  
 15 emulsiones de aceite, productos de micobacterias, saponinas, productos sintéticos y  
 citoquinas. Los adyuvantes incluyen, sin limitarse a, adyuvante de Freund, completo o  
 incompleto, adyuvante de oro Titermax, alumbre y LPS bacteriano.

El término “agente anticoagulante” o simplemente “anticoagulante” se refiere en la presente  
 20 invención a una sustancia endógena o exógena que interfiere o inhibe la coagulación de la  
 sangre. Ejemplos no limitativos de anticoagulantes son los inhibidores de la antitrombina III  
 como las heparinas de bajo peso molecular ardeparina, certoparina, nadroparina, logiparina,  
 parnaparina, reviparina y tedelparina, y la antitrombina III recombinante; inhibidores del  
 complejo factor tisular (TF)-factor VIIa tales como mutantes del TF, anticuerpos anti-TF,  
 25 inhibidores del factor VII; inhibidores de la trombina tales como los inhibidores del factor Xa  
 antistatina, TAP (*tick anticoagulant peptide*), DX9065, lefaxina, fondaparinux, terostatina,  
 YM-75466 y ZK-807834, anticuerpos contra el factor IXa y Xa, activadores de la vía de la  
 proteína C e inhibidores selectivos de la trombina como argatrobán, bivaluridina, efegatrán,  
 H376/95, hirugén, inogatrán, melagatrán, napsagatrán, UK-156406 y ximelagatrán,  
 30 compuestos químicos que captan iones de calcio, como el ácido etilenediaminotetraacético  
 (EDTA), citrato (normalmente citrato sódico) y oxalato, y anticoagulantes de tipo cumarínico.

En el contexto de la presente invención, el agente anticoagulante es de tipo cumarínico, en particular, un agente anticoagulante oral de tipo cumarínico.

El término “agente anticoagulante de tipo cumarínico” hace referencia a un agente  
5 anticoagulante que es un antagonista de la vitamina K y que inhibe los factores de  
coagulación II (protrombina), VII, IX y X. Entre los agentes anticoagulantes de tipo  
cumarínico se tienen la cumarina y sus derivados indandiona, brodifacouma, warfarina,  
acenocumarol (acenocumarón, acenocumarina, nicumalona, Sintrom®, Sinthrome®, 4-  
hydroxy-3-[1-(4-nitrophenyl)-3-oxobutyl]chromen-2-one), fenprocumarol (fenprocumón),  
10 warfarina (Aldocumar®). En una realización particular de la invención, el agente  
anticoagulante de tipo cumarínico es un agente anticoagulante oral. En una realización  
preferida, el agente anticoagulante de tipo cumarínico se selecciona del grupo formado por  
acenocumarol, warfarina y fenprocumón.

15 El término “anticuerpo”, tal como aquí se utiliza en la presente invención, se refiere a  
moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de  
inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se  
une específicamente (inmunorreacciona) con un antígeno, tal como, por ejemplo, una  
proteína. Hay 5 isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM),  
20 inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e  
inmunoglobulina E (IgE). El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales, o  
anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos,  
humanizados y de origen no humano. Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones  
homogéneas de anticuerpos idénticos, producidos por una célula híbrida producto de la  
25 fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula  
plasmática tumoral, que están dirigidos contra un único sitio o determinante” antigénico. Los  
“anticuerpos policlonales” incluyen poblaciones heterogéneas de anticuerpos, que están  
dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

30 El término “conjugado” hace referencia en la presente invención al complejo formado por la  
unión covalente de un hapteno de acuerdo con la invención y un segundo componente  
seleccionado del grupo formado por una proteína portadora o un fragmento de la misma que  
confiere antigenicidad, un oligonucleótido, una etiqueta detectable y un polímero o un  
soporte inorgánico, en particular hace referencia al complejo hapteno-proteína portadora.  
35 Métodos para la obtención de conjugados hapteno-proteína son conocidos por el experto en  
la materia.

El término “desproteización” empleado en la invención se refiere a un proceso de eliminación de proteínas en una muestra biológica, bien mediante precipitación de las proteínas o mediante hidrólisis proteica mediada por enzimas proteolíticas.

5

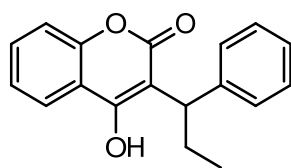
El término “etiqueta detectable” o “marcaje” hace referencia a una etiqueta molecular que permite la detección, localización y/o identificación de la molécula a la que está unido, mediante procedimientos y equipamiento adecuados para la detección, bien mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Ejemplos de etiquetas detectables para el marcaje de compuestos incluyen, aunque no se limitan a, isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos, haptenos, enzimas y combinaciones de éstos. Métodos para el marcaje y guía para la elección de marcajes adecuados para diferentes propósitos se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989) y Ausubel et al. (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998). Así, en una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende una etiqueta detectable.

10

15

20

El término “fenprocumón” (PPC) hace referencia a un agente anticoagulante derivado de la cumarina. Actúa como antagonista de la vitamina K, que inhibe la coagulación mediante la neutralización de la síntesis de los factores de coagulación II, VII, IX y X. Tiene como fórmula:

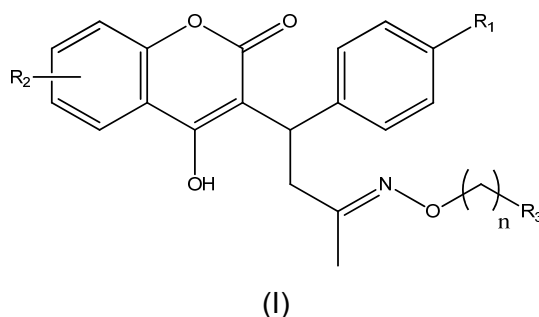


(V)

25

El término “hapteno”, tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una molécula de bajo peso molecular que por sí sola no es capaz de generar una respuesta inmune en un animal y necesita estar unida a una molécula portadora para generar una respuesta inmune. Por lo tanto, el hapteno es una molécula pequeña de carácter no inmunógeno con capacidad de inducir la formación de anticuerpos cuando está unida a una proteína portadora. En la presente invención, el hapteno es un derivado de un agente anticoagulante de tipo cumarínico de fórmula (I):

30



El término “inmunoensayo” es un método inmunoquímico en el que se emplea un anticuerpo  
 5 que se une específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de  
 propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigir y/o  
 cuantificar el antígeno. Los inmunoensayos comprenden, sin limitarse a, técnicas  
 inmunológicas tales como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), Western-blot, RIA  
 (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo de enzima competitivo), DAS-ELISA  
 10 (*Double Antibody Sandwich-ELISA*), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas,  
 técnicas basadas en el uso de biochips de biomarcadores, de biosensores o microarrays  
 que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en  
 formatos tales como los “*dipsticks*”. Dentro de otros inmunoensayos también se encuentran  
 los inmunosensores cuyo principio de transducción puede ser óptico, electroquímico, másico  
 15 o termométrico.

El término “inmunógeno” hace referencia a una molécula capaz de unirse a un anticuerpo y  
 de generar una respuesta inmune de generación de anticuerpos. En el contexto de la  
 presente invención, el inmunógeno hace referencia a un hapteno de acuerdo a la invención  
 20 conjugado con una proteína portadora, siendo dicha proteína la responsable del carácter  
 inmunogénico del conjugado.

El término “método de detección” hace referencia a un método que permite establecer si una  
 muestra determinada comprende o no comprende agentes anticoagulantes de tipo  
 25 cumarínico con una sensibilidad y especificidad adecuadas. Los intervalos típicos de  
 sensibilidad de detección pueden estar entre aproximadamente el 0,01% y  
 aproximadamente el 100%, entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 50%,  
 entre aproximadamente el 0,01 y aproximadamente el 10% tal como entre aproximadamente  
 el 0,1% y aproximadamente el 5%. La sensibilidad de un método de detección viene dada  
 30 por la probabilidad de que la detección sea positiva en una muestra que contiene el  
 compuesto que se pretende detectar. La sensibilidad, expresada en tanto por ciento,  
 representa el porcentaje de casos de detección positiva respecto al total de casos en los que

el compuesto a detectar está presente. A mayor sensibilidad, mayor número de casos positivos y menor número de falsos negativos. La especificidad de un método de diagnóstico viene dado por la probabilidad de que la detección sea negativa en una muestra que no contiene el compuesto que se pretende detectar. La especificidad, expresada en tanto por  
5 ciento, representa el porcentaje de casos de detección negativa respecto al total de casos en los que el compuesto a detectar está ausente. A mayor especificidad, menor es la probabilidad de obtener un falso positivo.

El término "método de cuantificación" hace referencia a un método que permite establecer la  
10 concentración de agente anticoagulante de tipo cumarínico presente en una muestra. En el caso particular de una muestra de plasma, la concentración habitual de acenocumarol (ACL) es de 0,03-0,3  $\mu\text{M}$ , la de warfarina (W) es de 1,5-8  $\mu\text{M}$  y la de fenprocumón (PPC) es de 1,5-15  $\mu\text{M}$ .

15 El término "muestra", tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una muestra, susceptible de contener anticoagulante de tipo cumarínico obtenida a partir del sujeto bajo estudio (salvo que se indique lo contrario), tal como una muestra de sangre, de suero o de plasma obtenida a partir de dicho sujeto. En una realización particular, dicha muestra de sangre comprende sangre periférica. El término "sangre periférica" se relaciona  
20 con el volumen de sangre circulante distante del corazón, esto es, la sangre que circula por el organismo de un sujeto. La muestra de sangre puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por el técnico en la materia. El término "suero", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al componente de la sangre resultante tras la coagulación de ésta y eliminación del coágulo resultante. Métodos de obtención de muestras  
25 de sangre a partir de un sujeto están ampliamente recogidos en el estado de la técnica, así como métodos de obtención de suero a partir de muestras de sangre. El término "plasma" se refiere a la parte líquida y acelular de la sangre.

El término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico de al menos 4, preferiblemente al  
30 menos 10, preferiblemente al menos 15, preferiblemente no más de 100 nucleótidos. Se contemplan tanto oligonucleótidos formados por nucleótidos convencionales unidos por enlaces fosfodiéster convencionales como variantes de los mismos que incluyen modificaciones en los restos de purina o pirimidina y modificaciones en los restos de ribosa o desoxirribosa. .

35

En la presente invención, el término "polímero" se refiere a una macromolécula formada por la unión de una cantidad finita de moléculas más pequeñas llamadas monómeros, que le confieren un alto peso molecular. El término polímero incluye oligómeros y tanto homopolímeros como copolímeros, y puede seleccionarse entre polímeros naturales y  
 5 sintéticos. Ejemplos de polímeros útiles en la presente invención son, sin limitarse a, dextrano simple o modificado, polipirrol, polianilina, ácido poliláctico, polietilenglicol o polilisina.

La expresión "poner en contacto con" de la presente invención hace referencia al proceso  
 10 por el cual una muestra susceptible de comprender un agente anticoagulante de tipo cumarínico entra en contacto con un anticuerpo según la invención. Esta expresión incluye cualquier proceso *in vitro* de poner en contacto tal muestra con el anticuerpo según la invención.

15 El término "proteína portadora" o "proteína transportadora" o "portador", en el contexto de la presente invención, hace referencia a una proteína o a un fragmento de la misma que, al unirse a un hapteno, es responsable de que dicho hapteno, en un organismo animal, se convierta en un inmunógeno con la capacidad de inducir la formación de anticuerpos. En dicho conjugado el hapteno es el responsable de inducir la especificidad deseada en la  
 20 respuesta inmune, y la molécula transportadora es la responsable de conferir antigenicidad al hapteno, esto es, la capacidad de comportarse como un antígeno. Las proteínas útiles como moléculas transportadoras para esta invención son proteínas con una masa molecular superior a 10 kDa, preferiblemente superior a 15 kDa. Ejemplos de proteínas transportadoras de acuerdo a la invención incluyen, sin limitarse a, hemocianina de cangrejo  
 25 herradura (HCH), hemocianina de lapa (KLH), seroalbúmina de diversas especies tal como la seroalbúmina bovina (BSA), de conejo (RSA), peroxidasa de rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA), conalbúmina (CONA), tiroglobulina y fibrinógeno, así como fragmentos de dichas proteínas que confieren antigenicidad. Proteínas transportadoras preferidas según la invención son hemocianina de cangrejo herradura (HCH), seroalbúmina bovina (BSA),  
 30 peroxidasa de rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA) y conalbúmina (CONA), así como fragmentos de las mismas que confieren antigenicidad.

Las expresiones "se une específicamente a" o "específicamente inmunorreactivo con", en relación a un anticuerpo, se refieren a una reacción de unión que es determinante de la  
 35 presencia de un antígeno o de un inmunógeno determinado en presencia de una población heterogénea de proteínas, sacáridos y otros productos biológicos. Por tanto, en condiciones

de inmunoensayo establecidas, los anticuerpos específicos se unen preferentemente a un antígeno o a un inmunógeno particular y no se unen en cantidad significativa a otras moléculas presentes en la muestra. La unión específica a un antígeno o a un inmunógeno en tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para un antígeno o inmunógeno particular. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayos para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con un antígeno o inmunógeno particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con un antígeno. Véase, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

Las expresiones “se une específicamente (o selectivamente) a un anticuerpo” o “específicamente (o selectivamente) inmunorreacciona con”, cuando se refiere a una proteína o péptido, en particular en el contexto de la presente invención a un conjugado con carácter inmunógeno de acuerdo a la invención, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del conjugado, con frecuencia en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular al menos dos veces el nivel de fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el nivel de fondo. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales hechos contra la proteína IgE, variantes polimórficas, alelos, ortólogos y variante conservadoramente modificadas, o variantes de ajuste, o partes de las mismas, se pueden seleccionar para obtener solo esos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con proteínas IgE y no con otras proteínas. Esta selección se puede lograr restando los anticuerpos que dan reacción cruzada con otras moléculas. Se pueden usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con un antígeno.

El término “soporte”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier material sólido al que los componentes de la invención, en particular los anticuerpos de la invención, se encuentran unidos físicamente, quedando así inmovilizados. Se puede emplear



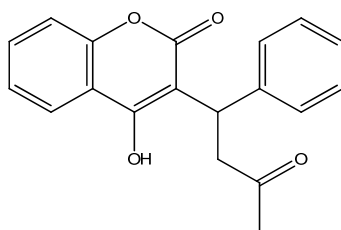
cualquiera de una amplia variedad de soportes sólidos en los inmunoensayos de la presente invención. Los materiales adecuados para el soporte sólido son sintéticos como poliestireno, cloruro de polivinilo, poliamida u otros polímeros sintéticos, polímeros naturales tales como celulosa, así como polímeros naturales derivados tales como acetato de celulosa o  
5 nitrocelulosa, y vidrio, especialmente fibras de vidrio. El soporte puede tomar la forma de esferas, bastones, tubos y placas de microensayo o microtitulación. Las estructuras similares a láminas tales como tiras de papel, placas pequeñas y membranas también son adecuadas. La superficie de los soportes puede ser permeable e impermeable para soluciones acuosas. Soportes sólidos adicionales adecuados para su uso en la presente  
10 invención incluyen, sin limitación, silicona, cristal, cuarzo, poliimida, acrilato, polimetilmetacrilato, cerámica, nitrocelulosa, metales, carburo de silicio amorfo, poliestireno así como cualquier otro material adecuado para microfabricación o microlitografía.

El término "sujeto", como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como  
15 mamíferos e incluye, pero no se limita a, los animales domésticos y de granja, los primates y los seres humanos, seres humanos, por ejemplo, los primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto o paciente es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

20 El término "tratamiento", en el contexto de la presente invención, se refiere al conjunto de medios de cualquier clase, higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos o físicos, cuya finalidad es la prevención y/o curación o alivio de una enfermedad o patología o de sus síntomas. En un caso concreto, dicho tratamiento es un tratamiento farmacológico, es decir, un tratamiento que comprende la administración de un fármaco a un sujeto para prevenir, aliviar  
25 y/o curar una enfermedad o para aliviar, reducir o eliminar uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad. En el contexto de la presente invención, el tratamiento aplicado al sujeto es un tratamiento de tipo farmacológico basado en un agente anticoagulante oral de tipo cumarínico y que está dirigido a tratar una patología o enfermedad susceptible de ser tratada con dicho fármaco.

30 El término "warfarina" (W) hace referencia en la presente invención a un anticoagulante de tipo cumarínico empleado para la prevención de trombos y émbolos, que inhibe la producción de factores de coagulación dependientes de la vitamina K. Es un derivado del anticoagulante natural dicumarol. La warfarina tiene la siguiente fórmula (VI):

35

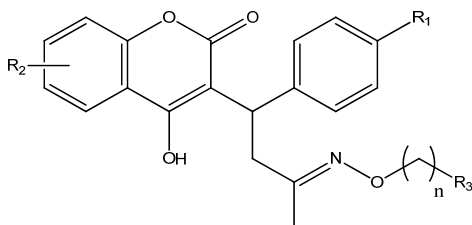


(VI)

Hapteno de la invención

5

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un hapteno (de ahora en adelante, hapteno de la invención), donde dicho hapteno tiene la fórmula (I):



(I)

10

donde

$R_1$  se selecciona de entre H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_2$ , halógeno, OH, O- $\text{C}_{1-4}$  alquilo,  $\text{NHCOCH}_3$ ,  $\text{CF}_3$  y  $\text{OCF}_3$ ;

15  $R_2$  se selecciona de entre halógeno, OH,  $\text{C}_{1-4}$  alquilo y O- $\text{C}_{1-4}$  alquilo;

$n$  es un número entero entre 1 y 6.

$R_3$  se selecciona de entre  $\text{COOH}$ ,  $\text{CHO}$ , halógeno,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ , OH y SH

En una realización particular,  $R_1$  se selecciona entre H y  $\text{NO}_2$ .

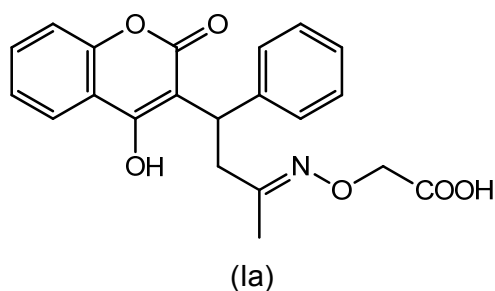
En otra realización particular,  $R_2$  es H.

20 En otra realización particular  $R_3$  es  $\text{COOH}$ .

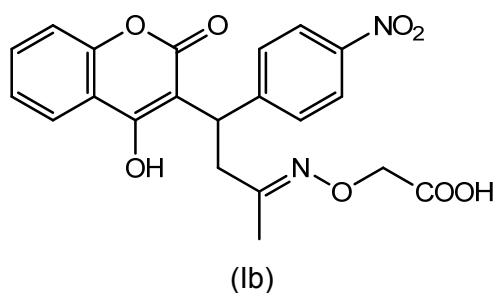
En otra realización particular,  $n$  es 1.

En una realización preferente,  $R_1=\text{H}$ ,  $R_2=\text{H}$ ,  $n=1$  y  $R_3=\text{COOH}$ , siendo este hapteno el ácido 2-(((4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-fenilbutan-2-iliden)amino)oxi)acético. En lo sucesivo, este compuesto se denomina "hapteno derivado de warfarina de la invención" o

25 simplemente "h<sub>w</sub>", y tiene como fórmula (Ia):



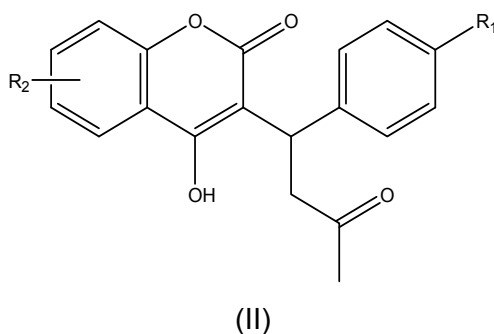
En otra realización preferente,  $R_1=NO_2$ ,  $R_2=H$ ,  $n=1$  y  $R_3=COOH$ , siendo este hapteno el  
 5 ácido 2-(((4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-nitrofenil)butan-2-iliden)amino)oxi)acético. En lo sucesivo, este compuesto se denomina “hapteno derivado de acenocumarol de la invención” o simplemente “ $h_{ACL}$ ”, y tiene como fórmula (Ib):



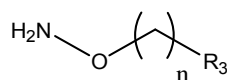
10

Método de síntesis del hapteno de la invención

Los autores de la presente invención han logrado sintetizar los haptenos anteriormente  
 15 descritos a partir de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico (ver apartados 1.3 y 2.1 correspondientes al Ejemplo 1). Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de un hapteno según la invención (en lo sucesivo, procedimiento de preparación del hapteno de la invención) a partir de un agente anticoagulante de tipo cumarínico que comprende hacer reaccionar el agente anticoagulante  
 20 de tipo cumarínico de fórmula (II)



con un compuesto de fórmula (III):



(III)

en condiciones básicas.

- 5 En una realización particular de la invención, el agente anticoagulante de tipo cumarínico a partir del cual se obtiene el hapteno de fórmula I según la invención se selecciona del grupo formado por warfarina y acenocumarol.

En una realización preferida, la síntesis del hapteno  $h_W$ , es decir, el hapteno de fórmula (I) en el que  $R_1=R_2=H$ ,  $n=1$  y  $R_3=COOH$ , tiene lugar a partir de warfarina. Este hapteno conserva como epítomos los anillos de 4-hidroxi-cumarina y fenilo y, de acuerdo a la invención, tal como se explicará a continuación, se emplea en la generación de anticuerpos específicos de warfarina y de fenprocumón. En esta realización, el procedimiento para la preparación del hapteno  $h_W$  comprende por tanto la reacción de warfarina (compuesto de fórmula (II) donde  $R_1=R_2=H$ ) con un compuesto de fórmula (III) en el que  $R_3=COOH$  y  $n=1$ .

En otra realización particular, la síntesis del hapteno  $h_{ACL}$ , es decir, el hapteno de fórmula (I) en el que  $R_1=NO_2$  y  $R_2=H$ ,  $n=1$  y  $R_3=COOH$ , tiene lugar a partir del agente anticoagulante de tipo cumarínico acenocumarol. Este hapteno conserva como epítomos característicos los anillos de 4-hidroxi-cumarina y 4-nitro-fenilo y, de acuerdo a la invención, tal como se explicará a continuación, se emplea en la generación de anticuerpos específicos de acenocumarol. En esta realización, el procedimiento para la preparación del hapteno  $h_{ACL}$  comprende por tanto la reacción de acenocumarol (compuesto de fórmula (II) donde  $R_1=NO_2$  y  $R_2=H$ ) con un compuesto de fórmula (III) en el que  $R_3=COOH$  y  $n=1$ .

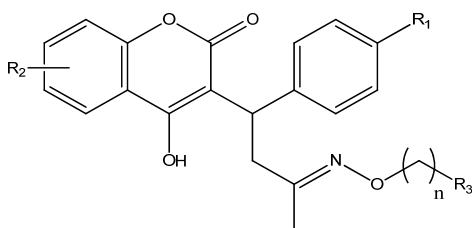
25

En una realización preferente, la síntesis de los haptenos  $h_W$  y  $h_{ACL}$  según la invención comprende hacer reaccionar el agente anticoagulante de tipo cumarínico con hemihidrocloruro de (carboximetoxil)amina en condiciones básicas mediante, por ejemplo, KOH/etanol, tal como se describe en el apartado "1.3 Síntesis de haptenos" del ejemplo 1 de la invención. En una realización preferida de la invención, el hapteno  $h_W$  se sintetiza a partir de warfarina, de modo que warfarina se hace reaccionar con hemihidrocloruro de (carboximetoxil)amina en KOH/etanol. En otra realización preferida de la invención, el hapteno  $h_{ACL}$  se sintetiza a partir de acenocumarol, de modo que acenocumarol se hace reaccionar con hemihidrocloruro de (carboximetoxil)amina en KOH/etanol.

35

Conjugado de la invención

Los autores de la presente invención han obtenido conjugados de los haptenos descritos anteriormente. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un conjugado (conjugado de la invención) que comprende un hapteno y una proteína transportadora, en donde el hapteno tiene la fórmula (I):



donde

10  $R_1$  se selecciona de entre H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_2$ , halógeno, OH, O-C1-4 alquilo,  $\text{NHCOCH}_3$ ,  $\text{CF}_3$  y  $\text{OCF}_3$ ;

$R_2$  se selecciona de entre halógeno, OH, C1-4 alquilo y O-C1-4 alquilo;

$n$  es un número entero entre 1 y 6.

$R_3$  se selecciona de entre  $\text{COOH}$ ,  $\text{CHO}$ , halógeno,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ , OH y SH,

15

En una realización particular,  $R_1$  se selecciona entre H y  $\text{NO}_2$ .

En otra realización particular,  $R_2$  es H.

En otra realización particular  $R_3$  es  $\text{COOH}$ .

En otra realización particular,  $n$  es 1.

20 En una realización preferente,  $R_1=\text{H}$ ,  $R_2=\text{H}$ ,  $n=1$  y  $R_3=\text{COOH}$ .

En otra realización preferente,  $R_1=\text{NO}_2$ ,  $R_2=\text{H}$ ,  $n=1$  y  $R_3=\text{COOH}$

El hapteno que forma parte del conjugado de la invención se ha descrito anteriormente en el apartado "Hapteno de la invención".

25

En una realización particular, el conjugado según la invención tiene carácter inmunógeno, es decir, induce la formación de anticuerpos. Así, el conjugado de la invención comprende un hapteno tal como se ha descrito anteriormente y una proteína portadora, en donde dicha proteína portadora es responsable del carácter inmunógeno del conjugado de la invención.

30 Es conocido por el experto en la materia que la intensidad de la respuesta de un sujeto a un inmunógeno viene dada por factores tales como el tamaño del inmunógeno, sus

características químicas, y su diferencia con respecto a las proteínas propias del sujeto en el que se produce la inmunización. En general, los inmunógenos tienen un peso molecular mayor a 5 kDa, y su procedencia filogenética es lejana con respecto a la del sujeto en el que se produce la inmunización.

5

El proceso de inmunización frente al conjugado de la invención requiere que dicho conjugado se encuentre altamente purificado. La respuesta frente a un inmunógeno aumenta conforme se produce la exposición repetida a dicho inmunógeno, o bien el inmunógeno se administra en combinación con un adyuvante adecuado.

10

La proteína portadora del conjugado según la invención es una proteína que, conjugada al hapteno según la invención, confiere inmunogenicidad a dicho hapteno. Métodos para determinar que un conjugado es inmunogénico son conocidos por el experto en la materia, y comprenden, sin quedar limitados a, la determinación de la generación de anticuerpos específicos frente a dicho inmunógeno mediante técnicas tales como ELISA, western blotting, etc.

15

Proteínas portadoras preferidas según la invención son hemocianina de cangrejo herradura (HCH), seroalbúmina bovina (BSA), peroxidasa de rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA) y conalbúmina (CONA). En una realización particular de la invención, la proteína portadora que forma parte del conjugado de la invención se selecciona del grupo formado BSA y HCH.

20

La presente invención también contempla variantes de proteínas portadoras, con una similitud de al menos un 80%, 85%, 90%, 95% o 99% respecto a la proteína portadora. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencia para comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith-Waterman, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman-Wunsch, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson-Lipman, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos o mediante alineamiento manual e inspección visual. Véase, Smith T, Waterman M, Adv. Appl. Math. 1981; 2:482-489; Needleman S, Wunsch C, J. Mol. Biol. 1970; 48:443-453; Pearson W, Lipman D, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:2444-2448; los programas GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA, paquete de software genético de Wisconsin, Genetics Computer Group, Madison, WI, EE UU; Ausubel F, et al., Eds, "Short Protocols in Molecular Biology", 4ª Ed. (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, NY, EE UU, 2002).

30

35

Conocidos el peso molecular de la proteína portadora, del hapteno y del conjugado resultante, el experto en la materia puede determinar la densidad de hapteno para un conjugado determinado. Valores de densidad de hapteno adecuados se establecen entre 1 y 10, preferiblemente entre 1 y 9, aún más preferiblemente entre 2 y 8.

5

En los conjugados de la invención entre un hapteno y una proteína portadora, dicha proteína se une al hapteno de forma covalente por medio de los aminoácidos accesibles en su superficie, preferiblemente aquellos aminoácidos con cadenas laterales de tipo nucleófilo. El aminoácido reactivo de la proteína se selecciona del grupo formado por, pero sin quedar limitado a, cisteína, serina, tirosina y lisina, preferiblemente lisina.

10

En una realización particular, el hapteno según la invención puede estar unido a una etiqueta detectable, a modo de marcador para su detección. En una realización particular alternativa, el hapteno puede estar unido a un polímero o a un soporte, en particular a un polímero o a un soporte inorgánico. En una realización particular alternativa, el hapteno según la invención puede estar unido a un oligonucleótido.

15

#### Método de síntesis del conjugado de la invención

La unión de los haptenos a las proteínas, generalmente ocurre por los grupos más reactivos de las proteínas:  $\epsilon$ - y  $\alpha$ -amino, fenólico, sulfhidrilo, imidazólico y carboxilo. Los procedimientos para lograr la conjugación de haptenos a otras moléculas portadoras dependen del grupo funcional presente en la molécula de hapteno en cuestión. También hay que tener en cuenta la estabilidad y la solubilidad del hapteno. Por lo tanto, dada la gran variedad de haptenos que existen, no hay un método común de conjugación.

25

En una realización de la presente invención, el hapteno de fórmula (I) de la invención se conjuga a la proteína portadora a través del grupo  $R_3$  de dicho hapteno.

Cuando el grupo  $R_3$  del hapteno es un ácido carboxilo (COOH), para la conjugación puede utilizarse, entre otros, el método del anhídrido mixto, el método de la carbodiimida (CDI) o el método del éster-N-hidroxisuccinimida (NHS) (este último también conocido como método del éster activo).

30

Cuando el grupo  $R_3$  del hapteno es un aldehído (CHO), este puede ser transformado en grupo carboxilo mediante la formación de O-(carboximetil)oximas. La reacción se efectúa

35

tratando el hapteno con O-(carboximetil)hidroxilamina. La reacción del ácido carboxílico formado con la proteína se continúa por uno de los métodos antes mencionados. Los haptenos que presentan grupos formilo también pueden ser acoplados directamente a través de la formación de las bases de Schiff, que son transformadas a aminas por  
5 reducción con borohidruro de sodio.

Cuando el grupo  $R_3$  del hapteno es un halógeno la conjugación se realiza sobre una proteína o péptido previamente modificado de forma que tenga grupos tiol reactivos. Un ejemplo supone hacer reaccionar la proteína seleccionada con cisteína mediante formación  
10 de enlaces amida tanto con el grupo ácido como el grupo amino. O introducir grupos tiol mediante reacción de un amino-tiol como la cisteamina.

Cuando el grupo  $R_3$  del hapteno es un grupo sulfhidrilo o mercapto (SH), el hapteno se conjuga a proteínas con maleimidias, o bien por activación de las proteínas con  
15 bromoacetamida, o por formación de puentes disulfuro entre la proteína portadora y el hapteno en tampón acetato pH 4,0 en presencia de peróxido de hidrógeno.

Cuando el grupo  $R_3$  del hapteno es un grupo amino reducible, el grupo amino alifático puede ser conjugado a las proteínas por algunos de los métodos anteriormente mencionados para  
20 los ácidos carboxílicos, o bien por conversión de la amina alifática en amina aromática por tratamiento con cloruro de p-nitrobenzoílo y posterior reducción a la p-aminobenzolamida, cuyo producto es después convertido a la correspondiente sal de diazonio por reacción de diazotación y, posteriormente, se lleva a cabo la conjugación con la proteína a pH 9.

25 En el caso de haptenos en los que  $R_3$  es un grupo hidroxilo, generalmente la conjugación directa no es posible. La transformación de un alcohol al hemisuccinato introduce un grupo carboxilo que puede emplearse para la conjugación con la proteína mediante métodos tales como los descritos anteriormente.

30 Todos estos métodos de conjugación son bien conocidos del estado de la técnica y se describen de modo resumido en (Guerra M., Morris H. 2003. Revista Cubana de Química, vol. XV, nº 2) y de forma más extensa en (Bartos E., Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Barcelona, 1988, págs. 279-296). Dichos métodos se muestran aquí a título orientativo y no en sentido limitativo, ya que pueden emplearse otros métodos de  
35 conjugación conocidos por el experto en la materia.



En una realización particular, cuando el hapteno de fórmula (I) es el  $h_W$  o  $h_{ACL}$  (haptenos de fórmula Ia y Ib, respectivamente), el procedimiento para la obtención del conjugado de estos haptenos con la proteína portadora comprende la activación del ácido carboxílico del hapteno y la reacción del hapteno activado con la proteína portadora.

5

En una realización particular, la activación del ácido carboxílico ( $R_3$ ) se lleva a cabo mediante el método del anhídrido mixto, el método de la carbodiimida (CDI) o el método del éster N-hidroxisuccinimida (NHS).

- 10 El método del anhídrido mixto comprende hacer reaccionar el hapteno con un cloroformato de alquilo. El anhídrido de ácido formado se hace reaccionar con los grupos amino libres de la proteína a pH 9. En el método de la carbodiimida (CDI) se emplean como reactivos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC); N, N' -diciclohexilcarbodiimida (DCC) y p-toluenosulfonato de 1-ciclohexil-3-(2- morfoliniletíl) carbodiimida (CMC), entre otros. Las
- 15 condiciones de reacción comprenden pH 6 y agitación durante al menos 30 minutos. Una variante del método de la carboxidiimida es el procedimiento del éster N-hidroxisuccinimida (NHS), en el cual el hapteno, conteniendo el grupo carboxilo, se acopla a la NHS en presencia de DCC; el éster NHS obtenido se purifica, y a pH 7,4 se realiza la reacción con la proteína. El aislamiento del éster NHS antes del acoplamiento con la proteína, permite
- 20 controlar la proporción molar hapteno/proteína y la eliminación de las interferencias por la presencia de CDI libre. Por otra parte, el éster NHS es estable si se mantiene anhidro

En una realización preferida, la activación del ácido carboxílico se lleva a cabo mediante el método del anhídrido mixto.

25

- En una realización aún más preferida de la invención, la activación del ácido carboxílico se lleva a cabo mediante el método del anhídrido mixto (Salvador JP *et al.* 2010 J Chromatogr 878: 243), en donde el cloroformato de alquilo es el isobutilcloroformato. En una realización preferida de la invención, la activación del ácido carboxílico de  $h_W$  o de  $h_{ACL}$  se lleva a cabo
- 30 mediante isobutilcloroformato en presencia de tributilamina en dimetilformamida (DMF), tal como se describe en el apartado "1.4. Preparación de conjugados de proteínas" del Ejemplo 1 de la invención. El ácido carboxílico activado del hapteno se une a nivel de residuos de lisina accesibles en la superficie de la proteína portadora.

- 35 En una realización particular, la proteína portadora se selecciona del grupo formado por hemocianina de cangrejo herradura (HCH), albumina de suero bovino (BSA), peroxidasa de

rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA), conalbúmina (CONA). En una realización preferida, la proteína portadora se selecciona del grupo formado por BSA y HCH.

5 En una realización particular del conjugado de la invención, el hapteno y la proteína portadora están unidos mediante un agente de entrecruzamiento.

Para el entrecruzamiento proteico, los grupos funcionales proteicos a los que se dirigen los agentes de entrecruzamiento comprenden grupos amino, grupos  $\epsilon$ -amino de lisinas, grupos  $\alpha$ -amino terminal, grupos sulfhidrilo (-SH o grupos tioles) de cisteínas, grupos carbohidrato  
10 (en el caso de glucoproteínas) y grupos carboxilo.

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos amino,  $\epsilon$ -amino de lisinas y  $\alpha$ -amino terminal incluyen, sin limitarse a, imidoésteres y N-H-hidroxisuccinimida ésteres (NHS-ésteres).  
15

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos sulfhidrilo incluyen, sin limitarse a, maleimidias, haloacetilos (tales como iodoacetilo) y piridil disulfuro (piridilditioles).

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos carbonilo (tales como aldehídos o cetonas) por tratamiento oxidativo de los carbohidratos de glucoproteínas incluyen, sin limitarse a, reactivos que comprenden hidrazidas (-NH-NH<sub>2</sub>-).  
20

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos carboxilo incluyen, sin limitarse a, carbodiimidias.  
25

Como entiende el experto en la materia, la elección del agente de entrecruzamiento adecuado para la obtención de conjugados con carácter inmunógeno depende de los grupos funcionales presentes en el hapteno y la capacidad del conjugado hapteno-proteína portadora para actuar como inmunógeno. Dado que las proteínas portadoras habitualmente  
30 comprenden varios grupos carboxilo y amino primarios accesibles, un agente de entrecruzamiento habitual para la conjugación hapteno-proteína portadora es la carbodiimida, tal como EDC. La carbodiimida es un agente de entrecruzamiento de longitud cero que permite el acoplamiento directo entre grupos carboxilo (-COOH) y grupos amino primarios (-NH<sub>2</sub>). La carbodiimida reacciona en primer lugar con los grupos carboxilo dando  
35 lugar a intermediarios inestables altamente reactivos que pueden unirse a aminas primarias.

Todos estos métodos de conjugación también son útiles para la síntesis de conjugados entre un hapteno y una etiqueta detectable. Los métodos utilizados para la conjugación entre un hapteno y un agente de marcaje son conocidos del estado de la técnica. Como el experto en la materia apreciará, para llevar a cabo esta reacción es necesario que la  
5 etiqueta detectable posea un grupo funcional libre, preferiblemente un grupo funcional carboxilo, aldehído, halógeno, sulfhidrilo o amino.

La conjugación entre un hapteno de fórmula (I) y un polímero o un soporte inorgánico puede realizarse utilizando los mismos procedimientos que para la conjugación a proteínas o  
10 péptidos ya sea directamente si tienen grupos funcionales libres o mediante una modificación de los mismos que introduzca un grupo funcional reactivo. Clásicamente, para los soportes inorgánicos, esto se ha realizado para óxido de silicio y de otros metales mediante silanos heterobifuncionales o mediante tioles funcionalizados (para superficies de metales nobles). Mientras que para los polímeros se utilizan directamente aquellos que ya  
15 poseen grupos funcionales activos procedentes de su formulación de base.

#### Anticuerpo que reconoce el conjugado de la invención

Los autores de la presente invención han obtenido, mediante inmunización de animales con  
20 los conjugados de la invención, antisueros que comprenden anticuerpos policlonales específicos de dichos conjugados (ver apartado 1.5. "Producción de anticuerpos policlonales" y "2.3. "Selección de anticuerpos" en el Ejemplo 1). Esto muestra que el conjugado de la invención, de carácter inmunógeno, puede ser empleado para la generación de una respuesta inmune, en la cual se generan anticuerpos específicos frente a dicho  
25 conjugado inmunógeno. Por otro lado, los autores de la presente invención han determinado que dichos anticuerpos generados de modo específico frente al conjugado de la invención son capaces de reconocer y unirse específicamente a agentes anticoagulantes de tipo cumarínico de fórmula (II) (ver apartado 2.5 de los Resultados en el Ejemplo 1).

30 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo (anticuerpo de la invención) que reconoce específicamente el conjugado de la invención. Puesto que el conjugado de la invención comprende un hapteno derivado de un agente anticoagulante de tipo cumarínico, el anticuerpo de la invención, asimismo, reconoce específicamente agentes anticoagulantes de tipo cumarínico de los cuales se deriva el hapteno del conjugado.  
35 Asimismo, la invención se relaciona con un antisuero que comprende al anticuerpo que reconoce y se une específicamente al conjugado de la invención. Adicionalmente, la

invención se relaciona con el uso del anticuerpo o del antisuero que comprende dicho anticuerpo en la detección y/o cuantificación de anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto.

5 En general, los anticuerpos de la invención pueden ser obtenidos mediante una variedad de procedimientos conocidos por los técnicos en la materia. A modo ilustrativo, pueden citarse las siguientes publicaciones: *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
10 Spring Harbor, N.Y., (1988); *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Goding, 3rd Edition, Academic Press (1996). Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales secretados por hibridomas pueden ser purificados por métodos convencionales. En el apartado 1.5 del Ejemplo 1 se describe una realización particular para la obtención de anticuerpos de acuerdo a la presente invención.

15

Para la generación de anticuerpos, el conjugado inmunógeno puede ser administrado formando parte de una composición inmunogénica que puede comprender además un soporte farmacéuticamente aceptable. Dicho soporte puede aumentar la inmunogenicidad del conjugado o inducir títulos mayores de anticuerpos. Soportes útiles incluyen soportes  
20 poliméricos, que pueden ser naturales (por ejemplo, polisacáridos, polipéptidos o proteínas de bacterias o virus), materiales semisintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales a los que se pueden unir un grupo reactivo. También se pueden usar como soportes productos bacterianos y proteínas víricas (por ejemplo, antígeno de superficie y antígeno central del virus de la hepatitis B), así como proteínas de organismos superiores tal  
25 como hemocianina de lapa californiana, hemocianina de cangrejo bayoneta, edestina, seroalbúminas de mamífero e inmunoglobulinas de mamífero. Productos bacterianos adicionales para uso como soportes incluyen proteínas de la pared bacteriana y otros productos (por ejemplo, paredes celulares y lipopolisacárido (LPS) de estreptococos y estafilococos).

30

La composición inmunogénica que comprende el conjugado de la invención para la generación de anticuerpos se puede administrar por cualquier medio que conozca el experto en la materia, tal como mediante inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa, y administración oral, nasal o anal. Véase, Banga A, "Parenteral Controlled Delivery of  
35 Therapeutic Peptides and Proteins", en *Therapeutic Peptides and Proteins* (Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, EE UU, 1995). Para prolongar el tiempo durante el que

está disponible el conjugado para estimular una respuesta, se puede suministrar dicho conjugado como un implante, una inyección oleaginoso o como un sistema particulado. El sistema particulado puede ser una micropartícula, una microcápsula, una microesfera, una nanocápsula, o partícula similar. Véase Banga, 1995, anteriormente. Se ha mostrado que un  
5 soporte particulado basado en un polímero sintético actúa como adyuvante para aumentar la respuesta inmune, además de proporcionar una liberación controlada. También se pueden usar sales de aluminio como adyuvantes para producir una respuesta inmune.

Es conocido por el experto en la materia que, a partir de un inmunógeno determinado, es  
10 posible obtener anticuerpos monoclonales o antisueros usando protocolos convencionales (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Press, 1988). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo, puede inmunizarse con el conjugado inmunogénico según la presente invención. El conjugado inmunogénico también puede ser administrado en presencia de un adyuvante. Puede  
15 monitorizarse el avance de la inmunización mediante la detección de títulos de anticuerpo en plasma o suero. Pueden usarse ELISA convencional u otros inmunoensayos con el conjugado inmunógeno según la invención como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. En una realización particular, el anticuerpo inmunoespecífico no reacciona de manera cruzada sustancialmente con una proteína relacionada con la proteína portadora  
20 que forma parte del conjugado inmunógeno de la invención. Por “no reacciona de manera cruzada sustancialmente”, quiere decirse que el anticuerpo tiene una afinidad de unión para una proteína no homóloga que es al menos un orden de magnitud, más preferiblemente al menos 2 órdenes de magnitud, e incluso más preferiblemente al menos 3 órdenes de magnitud menor que la afinidad de unión del anticuerpo para el conjugado inmunógeno de la  
25 invención.

El anticuerpo de la invención incluye, sin quedar limitado a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab y Fv de cadena sencilla (scFv) de los mismos, anticuerpos biespecíficos, heteroconjugados, anticuerpos humanos y humanizados. Tales  
30 anticuerpos pueden producirse en una variedad de modos, incluyendo cultivos de hibridoma, expresión recombinante en cultivos de células de mamífero o bacterias y expresión recombinante en animales transgénicos. También pueden producirse anticuerpos seleccionando una secuencia de una biblioteca de secuencias expresadas en sistemas de presentación tales como fagos filamentosos, bacterias, levaduras o ribosomas. Existe una  
35 orientación abundante en la bibliografía para seleccionar una metodología de producción particular, por ejemplo, Chadd y Chamow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12:188-194 (2001). La

elección de la metodología de fabricación depende de varios factores que incluyen la estructura de anticuerpo deseada, la importancia de restos de hidratos de carbono en los anticuerpos, la facilidad de cultivo y purificación, y los costes. Pueden generarse muchas estructuras de anticuerpos diferentes usando tecnología de expresión convencional, 5 incluyendo anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y Fv, así como anticuerpos quiméricos que comprenden componentes de especies diferentes. Fragmentos de anticuerpo de tamaño pequeño, tales como fragmentos Fab y Fv, que no tienen funciones efectoras y que tienen actividad farmacocinética limitada pueden generarse en un sistema de expresión bacteriano. Fragmentos Fv de cadena 10 sencilla muestran baja inmunogenicidad y se eliminan rápidamente de la sangre.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales. Tales anticuerpos policlonales pueden producirse en un mamífero, tal como un mamífero no humano, por ejemplo, tras una o más inyecciones del conjugado y, opcionalmente, un adyuvante. 15 Normalmente, el conjugado y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante una serie de inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Si el suero contiene anticuerpos policlonales frente a epítomos no deseados, los anticuerpos policlonales pueden purificarse mediante cromatografía de inmunoafinidad.

20 Alternativamente, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos monoclonales. Pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante hibridomas, en los que se inmuniza un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con el conjugado de la invención para provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante (ver, por ejemplo, Kohler y Milstein 1975 Nature 25 256:495). Opcionalmente, el conjugado se introduce en el mamífero no humano en presencia de un adyuvante apropiado. Alternativamente, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Generalmente, se usan células del bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no humanos, o se usan linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano. Los linfocitos se fusionan con una línea de células inmortalizada 30 usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para producir una célula de hibridoma. En general, las líneas de células inmortalizadas son células de mieloma de origen de rata, ratón, bovino o humano. Las células de hibridoma se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de células no fusionadas, inmortalizadas. Se aíslan clones 35 usando el método de dilución limitativa y el medio de cultivo (sobrenadante) en el que las células de hibridoma se cultivan puede someterse a ensayo para detectar la presencia de

anticuerpos monoclonales dirigidos contra el conjugado según la invención mediante técnicas convencionales, tales como mediante citometría de flujo o mediante inmunoprecipitación o mediante otro ensayo de unión *in vitro*, tal como RIA o ELISA. También pueden cultivarse clones *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

5 Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos mediante un clon de células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o mediante técnicas inmunofluorescentes tales como microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales  
10 secretados por los subclones se separan de manera adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

15 Otro método de generación de anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, reactivos frente a una molécula diana es examinar bibliotecas de expresión que codifican para genes de inmunoglobulinas, o partes de los mismos, expresados en bacterias, levaduras, fagos filamentosos, ribosomas o subunidades ribosomales y otros sistemas de presentación. Estos métodos normalmente usan bibliotecas grandes de secuencias de  
20 anticuerpo o secuencias de fragmentos de anticuerpo obtenidas a partir de diversas fuentes tales como donantes sanos o pacientes o animales sanos o no. Estas secuencias se clonan y expresan en un sistema apropiado y se seleccionan por su afinidad de unión para el antígeno. Se han descrito diversos enfoques para seleccionar anticuerpos o fragmentos con propiedades deseadas por ejemplo neutralizantes, agonistas, etc. (Fernández, Curr. Op.  
25 Biotech., 15: 364-373 (2004); Schmidt, Eur. J. Biochem., 268: 1730-1738 (2001)). En una realización, también pueden producirse anticuerpos y fragmentos de anticuerpo característicos de hibridomas de la invención por medios recombinantes extrayendo ARN mensajero, construyendo una biblioteca de ADNc y seleccionando clones que codifican para segmentos de la molécula de anticuerpo.

30

Los anticuerpos también pueden modificarse mediante ingeniería genética para alterar sus usos clínicos. Numerosos enfoques hacen uso de la biología molecular y de técnicas genéticas tal como el buen conocimiento de la genética y la estructura de las inmunoglobulinas para construir diferentes modificaciones de la molécula de  
35 inmunoglobulina con el objetivo de mejorar sus propiedades para usos clínicos u otros usos. Algunos de ellos tienden a reducir la inmunogenicidad de la molécula en la especie en la

que debe usarse y la molécula resultante tiene una secuencia más homóloga con esta especie. Diversos métodos se han usado para obtener anticuerpos de origen humano evitando los procedimientos no admisibles éticamente en seres humanos sanos. En otros enfoques se reducen el peso y el tamaño moleculares por ejemplo con el fin de mejorar la  
 5 distribución de la molécula. Otras posibilidades son la conjugación en una molécula de dominios de unión para más de una molécula diana (anticuerpo biespecífico o también trispecífico, etc.) o la conjugación de un anticuerpo o un fragmento con otra molécula con la función deseada por ejemplo un agente tóxico, una hormona, un factor de crecimiento, un agente inmunomodulador (inmunosupresor o inmunoestimulante), un inhibidor del  
 10 crecimiento celular, etc. En general todas las moléculas resultantes conservan casi un dominio variable de un anticuerpo, lo que proporciona la alta especificidad y afinidad características de la unión antígeno-anticuerpo . Algunos ejemplos de estas construcciones son:

- 15 - Anticuerpos quiméricos: Éstos se refieren a anticuerpos contruidos con regiones variables de un anticuerpo de algunas especies (normalmente un mamífero en el que se generó el anticuerpo) y regiones constantes de otra especie (aquella en la que va a usarse el anticuerpo quimérico);
- 20 - Anticuerpos humanizados: Por “anticuerpo humanizado” quiere decirse un anticuerpo derivado de un anticuerpo no humano, normalmente un anticuerpo murino, que conserva las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo original, pero que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede conseguirse mediante diversos métodos, incluyendo (a) injertar todos los dominios variables no humanos en regiones constantes humanas para  
 25 generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) no humanas en regiones constantes y de entramado humanas con o sin retención de residuos de entramado críticos; y (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero “rodearlos” con una sección de tipo humano mediante la sustitución de residuos de superficie. En la técnica se han descrito métodos para humanizar  
 30 anticuerpos no humanos. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos “de importación”, que se toman normalmente de un dominio variable “de importación”. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al.,  
 35 Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de regiones hipervariables por



las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)). Además es importante que los anticuerpos se humanicen conservando su alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando los modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas.

- Anticuerpos primatizados: Una etapa siguiente en este enfoque de preparación de un anticuerpo más similar al de seres humanos son los denominados anticuerpos primatizados, es decir un anticuerpo recombinante que se ha modificado mediante ingeniería genética para contener los dominios pesado y ligero variables de un anticuerpo de mono (u otro primate), en particular, un anticuerpo de mono cynomolgus, y que contiene secuencias de dominios constantes humanos, preferiblemente el dominio constante de inmunoglobulina gamma 1 o gamma 4 humana (o variante PE). La preparación de tales anticuerpos se describe en Newman et al., Biotechnology, 10: 1458-1460 (1992); documentos US 5.658.570 y US 6.113.898. Se ha notificado que estos anticuerpos muestran un alto grado de homología con anticuerpos humanos, es decir, el 85-98%, presentan funciones efectoras humanas, tienen una inmunogenicidad reducida y pueden mostrar una alta afinidad con antígenos humanos. Otro medio altamente eficaz para generar anticuerpos recombinantes se da a conocer por Newman, Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992).

- Anticuerpos humanos: Por "anticuerpo humano" quiere decirse un anticuerpo que contiene la cadena ligera y pesada humana en su totalidad así como regiones constantes, producido mediante cualquiera de los métodos convencionales conocidos. Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, tras la inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen PH) de la región de unión a la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la inmunización. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Mad. Acad. Sci. USA, 90:255 1 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993). Alternativamente, puede usarse la tecnología de presentación en fago (McCafferty et

al., Nature 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulina de donantes. Según esta técnica, los genes de dominios V de anticuerpos se clonan en marco en un gen de la proteína de envuelta o bien principal o bien minoritaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica para el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fago puede realizarse en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). También pueden generarse anticuerpos humanos mediante células B activadas in vitro o ratones SCID con su sistema inmunitario reconstituido con células humanas. Una vez obtenido un anticuerpo humano, sus secuencias de ADN codificante pueden aislarse, clonarse e introducirse en un sistema de expresión apropiado, es decir, una línea celular preferiblemente de un mamífero que se expresa posteriormente y se libera al medio de cultivo a partir del cual puede aislarse el anticuerpo.

- Fragmentos de anticuerpo: Un fragmento de anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo tal como, por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y scFv. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos pero más recientemente estos fragmentos pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de Fv de cadena sencilla (scFv) que adicionalmente puede ser monoespecífico o biespecífico. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de unión a antígeno y que todavía puede reticular el antígeno. "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones

hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad inferior a la de todo el sitio de unión. El fragmento Fab

5 también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CHI) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxilo terminal del dominio CHI de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de

10 los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Se produjeron originariamente fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única

15 cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., págs. 269-315 (1994). El término "diacuerpos" se refiere a pequeños

20 fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza que los dominios se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos

25 sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

- Anticuerpos biespecíficos: Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen

30 especificidades de unión por al menos dos epítomos diferentes. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución al azar de

35 cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que sólo una tiene la

estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker et al., EMBO J, 10:3655-3659 (1991).

5

El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de la invención pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos de manera que, aunque se altera la secuencia primaria del polipéptido, se mantenga la capacidad del anticuerpo de unirse al conjugado de la invención. Dicha sustitución puede ser una sustitución conservativa y, en general, se aplica para indicar que la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades similares (por ejemplo, la sustitución del ácido glutámico (aminoácido cargado) por el ácido aspártico sería una sustitución de aminoácidos conservativa).

10

15

La presente invención también contempla variantes de las secuencias de las cadenas pesada y ligera. El término "variante", tal como aquí se utiliza, se refiere a secuencias sustancialmente similares. En general, las variantes poseen la misma actividad biológica, desde el punto de vista cualitativo, que la secuencia nativa. Una variante de una secuencia polipeptídica puede ser un derivado de una secuencia polipeptídica que comprende la adición, delección o sustitución de uno o más aminoácidos.

20

También se contempla que el anticuerpo de la invención puede estar marcado con una etiqueta detectable que permita su localización y/o identificación, mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Ejemplos de etiquetas para el marcaje incluyen, aunque no se limitan a, isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos, haptenos, enzimas y combinaciones de éstos. Métodos para el marcaje y guía para la elección de marcajes adecuados para diferentes propósitos se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 25 1989) y Ausubel et al. (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998). Así, en una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende una etiqueta detectable.

30

35

Así, en una realización particular, el anticuerpo de la invención está modificado de forma covalentemente de forma que sea posible su posterior detección. En principio, la invención contempla el uso de cualquier marcador siempre que sea posible la conjugación covalente al

anticuerpo y que permita la posterior detección de dicho anticuerpo. Así, la invención contempla la posibilidad de modificar el anticuerpo con un radioisótopo del tipo de  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  o  $^{213}\text{B}$ . El marcaje con radioisótopos se lleva a cabo típicamente mediante el uso de ligandos  
5 quelantes que son capaces de acomplejar iones metálicos tales como DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, Tex.).

En una realización particular alternativa, el anticuerpo de la invención se marca con un grupo fluorescente. El grupo fluorescente puede unirse a las cadenas laterales de los  
10 aminoácidos directamente o bien a través de un grupo conector. Preferiblemente, los grupos fluorescentes que se usan para el marcaje deben ser (i) grupos que den una buena señal en ausencia de fondo, (ii) grupos estables que permitan la detección de la señal sin fotoblanqueo significativo, (iii) grupos que tengan buena solubilidad en medios acuosos para facilitar el proceso de marcaje y/o (iv) grupos que no sean tóxicos o que alteren las proteínas  
15 de tal forma que pierdan la capacidad de unirse a sus dianas. Métodos para conjugar reactivos fluorescentes a polipéptidos son bien conocidos del estado de la técnica y han sido descrito, por ejemplo, en Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic  
20 Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in*  
25 *Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York; and Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis et al (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier et al (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237.

30

Los reactivos adecuados para el marcaje de polipéptidos, tales como anticuerpos, con grupos fluorescentes incluyen grupos químicos que muestren capacidad para reaccionar con los distintos grupos que aparecen en las cadenas laterales de las proteínas, incluyendo, grupos amino y grupos tiol. Así, grupos químicos que pueden ser usados para modificar los  
35 anticuerpos de acuerdo a la presente invención incluyen, sin limitación, maleimida, haloacetil, iodoacetamida éster succinimidil (por ejemplo, NHS, N-hidroxisuccinimida),

isotiocianate, sulfonil cloruro, 2,6-diclorotriazinil, éster pentafluorofenil, fosforamidita y similares. Un ejemplo de grupo funcional reactivo adecuado es el éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) de un grupo detectable modificado con un grupo carboxilo. Típicamente, el grupo carboxilo que modifica el compuesto fluorescente se activa mediante  
 5 la puesta en contacto de dicho compuesto con un reactivo de carbodiimida (por ejemplo, dicitohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio tal como el TSTU (O--(N-Succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato, HBTU (O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato), o HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato), un activador del tipo de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-  
 10 hydroxisuccinimida para dar lugar al éster NHS del marcador.

Compuestos fluorescentes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, bromuro de etidio, SYBR Green, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiol tetrametil rodamina (TRIT), 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína, , HEX  
 15 (6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Joe (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína),5-carboxy-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, 5-carboxirodamina, rodamina, tetrametilrodamina (Tamra), Rox (carboxi-X-rodamine), R6G (rodamina 6G), phthalocyanines, azomehines, cyaninas (Cy2, Cy3 y Cy5), Texas Red, Princeston Red, BODIPY FL-Br2, BODIPY 530/550, BODIPY  
 20 TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, DABCYL, Eosina, Eritrosina, bromuro de etidio, proteína verde fluorescente (GFP) y sus análogos, marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (Quantum dot), marcadores fluorescentes basados en lantánidos tales como Eu<sup>3+</sup> y Sm<sup>3+</sup> y similares.

25

En una realización particular alternativa, los anticuerpos se marcan mediante conjugación con un primer miembro de un par de unión. En una forma preferida, dicha modificación covalente es una biotinización. El término "biotinización", según se usa en la presente invención, se refiere a la unión covalente de biotina a una molécula (típicamente una  
 30 proteína). La biotinización se lleva a cabo usando reactivos capaces de conjugar biotina a la cadena lateral de las proteínas, en donde dicha conjugación tiene lugar fundamentalmente en los grupos amino primarios y en los grupos tioles que aparecen en las cadenas laterales de las proteínas. Reactivos adecuados para la biotinización de grupos amino incluyen moléculas que contienen biotina y un grupo capaz de reaccionar con grupos  
 35 amino tales como ésteres de succinimida, éster de pentafluorofenil o haluros de alquilo, estando el grupo biotina y el grupo reactivo separados por un espaciador de cualquier

longitud (por ejemplo, de 8-40 Å de longitud). Algunos ejemplos de estos agentes de biotinilación incluyen agentes NHS-biotina (que contiene un enlace éster de cinco átomos de carbono entre la biotina y el grupo NHS), , sulfo-NHS-biotina, NHS-LC-biotina, sulfo-NHS-LC-Biotina, NHS-LC-LC-biotina, sulfo-NHS-LC-LC-biotina, sulfo-NHS-SS-biotina, NHS-  
 5 PEO4-biotina, PFP-biotina, TFP-PEO-biotina y similares, en donde "NHS" indica un grupo N-hidroxisuccinimida, "LC" se refiere a un enlace tipo amida de 6 átomos de carbono localizado entre el grupo NHS y la biotina, "PEO" se refiere a un grupo etilenoóxido, en donde el subíndice indica el número de unidades PEO, "PFP" se refiere a un grupo pentafluorofenilo "TFP" se refiere a un grupo tetrafluorofenilo, "sulfo" se refiere a un grupo  
 10 sulfonato (SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>) and "SS" se refiere a un grupo disulfuro. Ejemplos de agentes de biotinilación reactivos con grupos tiol incluyen moléculas que comprenden biotina y un grupo del tipo maleimido o alquil haluro, separados por un espaciador de cualquier longitud. Ejemplos de reactivos de biotinilación incluyen maleimide-PEG-biotina, biotina-BMCC (que contiene un grupo maleimido N-terminal y un grupo ciclohexil, 2 enlaces amida y 9 átomos  
 15 de carbono enlazadores), PEO-iodoacetil biotina, iodoacetil-LC-biotina, biotina-HPDP (que contiene un grupo piridilo disulfuro) y similares.

Uso del anticuerpo de la invención

20 El anticuerpo de la invención puede ser utilizado en la determinación y/o cuantificación de anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo (uso del anticuerpo de la invención) que reconoce específicamente el conjugado de la invención en la detección y/o  
 25 cuantificación de anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto.

El uso del anticuerpo de la invención puede llevarse a cabo en cualquier tipo de técnica de tipo inmunoensayo dirigida a la detección, determinación y/o cuantificación de anticoagulantes de tipo cumarínico, en particular agentes anticoagulantes de fórmula (II), más en particular los seleccionados del grupo formado por warfarina y acenocumarol y  
 30 fenprocumón. Tales técnicas inmunológicas comprenden, sin limitarse a, ELISA, inmunoprecipitación, transferencia Western o Western blotting, dot blot, radioinmunoensayo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y citometría de flujo.

La técnica de transferencia Western se basa en la detección de proteínas previamente  
 35 separadas por electroforesis en un gel, en condiciones desnaturizantes e inmovilizadas en una membrana que posteriormente se incubaba con uno o más anticuerpos específicos para la

proteína y se detecta mediante un sistema, por ejemplo, quimioluminiscente o fluorescente. El análisis por inmunofluorescencia requiere el uso de un anticuerpo específico marcado con un compuesto fluorescente. El inmunoensayo conocido como dot blot comienza con la aplicación directa de la muestra (a través de un dispositivo que configura dicho depósito en un pocillo) en una membrana. Los pasos posteriores son iguales: incubación de la membrana con un suero y posterior marcaje y revelado.

El inmunoensayo conocido como ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con enzimas, de manera que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado resulte en la formación de complejos enzimáticamente activos. Debido a que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) están inmovilizados en un soporte, los complejos anticuerpo-antígeno están inmovilizados en el soporte y por tanto, pueden ser detectados por la adición de un sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable, por ejemplo, por espectrofotometría o fluorometría.

En una realización particular, los anticoagulantes se seleccionan del grupo formado por warfarina, acenocumarol y fenprocumón. En una realización particular, la muestra en la que se determina el nivel de anticoagulantes de tipo cumarínico procede de un sujeto bajo tratamiento con anticoagulantes. En una realización preferida, la muestra en la que se determinan los niveles de anticoagulantes es una muestra de sangre, de suero o de plasma. En una realización aún más preferida, la muestra en la que se determinan los niveles de anticoagulantes es una muestra de plasma.

25 Método de detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico de la invención

Los autores de la presente invención han mostrado que antisueros generados en conejos inmunizados con el conjugado según la invención comprenden anticuerpos que pueden ser empleados para la detección y la cuantificación de agentes anticoagulantes (ver apartados 2.3-2.5 del Ejemplo 1 de la invención). La presente invención proporciona así anticuerpos con aplicación en la detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección y/o cuantificación de anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto que comprende



- (i) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo que reconoce específicamente el conjugado de la invención o con un antisuero que comprende el anticuerpo anterior, y
- (ii) detectar la formación de complejos anticoagulante de tipo cumarínico-anticuerpo que reconoce específicamente el conjugado de la invención.

5

De este modo, en una primera etapa del método de detección y/o cuantificación de la invención, se pone en contacto una muestra de un sujeto con un anticuerpo que reconoce específicamente el conjugado de la invención o con un antisuero que comprende el anticuerpo anterior.

10

Métodos para la purificación de anticuerpos son conocidos del experto en la materia e incluyen, sin limitarse a, cromatografía de afinidad, de modo que el antígeno se inmoviliza sobre un soporte, tal como Sepharose, los anticuerpos inespecíficos no unidos se eliminan por lavado y el anticuerpo específico retenido es eluido mediante variación del pH o de la concentración salina amortiguadora. Los tampones tanto de unión como de elusión son componentes importantes en la purificación de anticuerpos. Generalmente, la fuerza iónica y el pH son los factores más importantes afectando la eficiencia de unión y consecuentemente la elusión de los anticuerpos. Sin embargo, la temperatura y otros componentes son también importantes en casos particulares.

15

20

Se puede usar cualquiera de una amplia variedad de formatos de inmunoensayo según el método de la presente invención. Tales formatos pueden ser heterogéneos u homogéneos, secuenciales o simultáneos, competitivos o no competitivos. Tales ensayos se pueden formatear para ser cuantitativos, para medir la concentración o cantidad de un agente anticoagulante de tipo cumarínico, o se pueden formatear para ser cualitativos, para medir la presencia o ausencia de un agente anticoagulante de tipo cumarínico.

25

Las técnicas de inmunoensayo heterogéneo implican típicamente el uso de un material de fase sólida al que se une el producto de reacción, pero se puede adaptar para implicar la unión de antígenos y anticuerpos no inmovilizados (es decir, un inmunoensayo en fase solución). El producto de reacción se separa del exceso de muestra, reactivos del ensayo y otras sustancias eliminando la fase sólida de la mezcla de reacción (por ejemplo, mediante lavados).

35

En una realización preferida del método de detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico de la invención, la detección y/o cuantificación se realiza mediante un ensayo de tipo ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, del inglés “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”). Este ensayo se basa en la premisa de que un  
5 inmunorreactivo (e.g., un antígeno o un anticuerpo) se inmoviliza sobre un soporte sólido, y, a continuación, ese sistema se pone en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede estar unido a un compuesto marcador. Así, en una realización particular, el conjugado que comprende un antígeno derivado de un agente anticoagulante de tipo cumarínico se inmoviliza sobre el soporte sólido, y este sistema se pone en contacto  
10 con una muestra susceptible de contener anticuerpos anti-agentes anticoagulantes de tipo cumarínico. En particular, el conjugado que se inmoviliza sobre el soporte se selecciona del grupo formado un conjugado que comprende  $h_{ACL}$ , un conjugado que comprende  $h_W$  y un conjugado que comprende 4-amino-acenocumarol. En una realización particular alternativa, el anticuerpo de la invención se inmoviliza sobre el soporte sólido, y este sistema se pone en  
15 contacto con la muestra susceptible de contener agentes anticoagulantes de tipo cumarínico.

Son conocidos diferentes tipos de ELISA, tales como el ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA tipo sándwich, de carácter competitivo o no competitivo.

20

En una realización particular de la invención, el ensayo de unión de la presente invención para la detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes se configura como un ensayo competitivo. En un ensayo competitivo, a mayor cantidad de agente anticoagulante presente en la muestra bajo ensayo, menor cantidad de marcador estará presente en la fase  
25 sólida. El ensayo competitivo se puede realizar suministrando una cantidad definida de un agente anticoagulante de tipo cumarínico marcado y determinando si la muestra bajo ensayo contiene agente anticoagulante de tipo cumarínico que competiría con el agente anticoagulante de tipo cumarínico marcado para unirse al soporte. En tal ensayo competitivo, la cantidad de agente anticoagulante de tipo cumarínico marcado capturado es  
30 inversamente proporcional a la cantidad de dicho agente anticoagulante presente en la muestra en ensayo. En este caso, la detección de la formación de complejos anticoagulante de tipo cumarínico-anticuerpo que reconoce específicamente el conjugado de la invención viene dada por una disminución de la detección de marcaje.

35 En el ELISA competitivo directo, el soporte sólido sobre el que se realiza el ensayo se prepara recubriendo la superficie de dicho soporte con el anticuerpo específico. Tras una

etapa de lavado se añade la muestra en la que se sospecha se encuentra el agente anticoagulante (o analito) de interés, y se incuba junto con el marcador enzimático unido al hapteno como competidor. Este tipo de ensayo es indicativo de la presencia de analito en la muestra analizada. Se incluyen muestras del mismo tipo a la muestra problema analizada, pero carentes del analito de interés, como controles negativos. Asimismo se incluyen controles positivos, o muestras en las que se encuentra presente en analito de interés.

En el ELISA competitivo indirecto, el soporte se prepara de la misma forma anterior pero esta vez inmovilizando el antígeno de interés. Tras la incubación y correspondiente lavado se añade la muestra sospechosa con el analito y después el anticuerpo específico. Se incluyen también controles positivos y negativos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. En este tipo de ensayo, un mismo anticuerpo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran variedad de antígenos.

En el ELISA no competitivo directo, se inmoviliza sobre el soporte sólido el anticuerpo, en particular un anticuerpo de acuerdo a la invención, añadiéndose a continuación el antígeno, que es reconocido por el anticuerpo inmovilizado y se une a éste. En una realización particular, se inmoviliza sobre el soporte sólido un anticuerpo según la invención, y se añade un conjugado de la invención marcado, por ejemplo, con HRP, que se une al anticuerpo inmovilizado. En una realización particular de la invención, este ensayo permite analizar los diferentes anticuerpos obtenidos y los conjugados producidos. En una realización preferida el antígeno utilizado es el que comprende un hapteno de fórmula (I) y HRP como marcador enzimático.

En el ELISA no competitivo indirecto, se inmoviliza sobre el soporte sólido el antígeno, en particular un conjugado según la invención, añadiéndose a continuación un primer anticuerpo que reconoce y se une al antígeno inmovilizado. El primer anticuerpo puede estar directamente conjugado a un agente de marcaje detectable o bien puede añadirse un segundo anticuerpo marcado que reconoce el primer anticuerpo. En una realización particular de la invención, este ensayo permite evaluar el título de anticuerpos generado en un animal no humano inmunizado midiendo la unión de diluciones seriadas de cada antisuero a placas de microtitulación tapizadas previamente con un conjugado según la invención, así como el rastreo de los diferentes anticuerpos obtenidos y los antígenos

producidos. En una realización preferida de la invención, el conjugado utilizado es el que comprende un hapteno de fórmula (I) y una proteína portadora seleccionada del grupo formado por BSA, OVA o CONA.

5 En una realización particular de la invención, la detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico se lleva a cabo mediante un ELISA de tipo directo, en el que el anticuerpo según la invención es inmovilizado sobre un soporte sólido. Dicho anticuerpo puede haber sido purificado previamente o bien formar parte de un antisuero. En una realización preferida, el ELISA de tipo directo es un ELISA directo competitivo. En una  
10 realización aún más preferida, el ELISA directo, preferiblemente ELISA directo competitivo, se emplea en la detección y/o cuantificación de acenocumarol. Según una forma de realización particular de la presente invención, el anticuerpo que reconoce específicamente el conjugado de la invención se une a un soporte sólido (es decir, queda inmovilizado) y se incuba en contacto con la muestra biológica en la que se ensaya la presencia y/o  
15 concentración de un agente anticoagulante de tipo cumarínico y un hapteno según la invención marcado mediante una etiqueta detectable. Opcionalmente, se puede añadir un agente bloqueante para reducir la unión no específica del anticuerpo al soporte.

En una realización particular alternativa de la invención, la detección y/o cuantificación de  
20 agentes anticoagulantes de tipo cumarínico se lleva a cabo mediante un ELISA de tipo indirecto, en el que el antígeno es inmovilizado sobre un soporte sólido. En una realización preferida, el ELISA de tipo indirecto es un ELISA indirecto competitivo. En una realización aún más preferida, el ELISA indirecto, preferiblemente ELISA indirecto competitivo, se emplea en la detección y/o cuantificación de warfarina. Según una forma de realización  
25 particular de la presente invención, el inmunorreactivo que se inmoviliza sobre el soporte sólido es un antígeno que es reconocido de modo específico por los anticuerpos de la invención, obtenidos tal y como se ha descrito anteriormente. Dicho anticuerpo puede haber sido purificado previamente o bien formar parte de un antisuero. El anticuerpo se pone en contacto con una muestra biológica que contiene el anticoagulante de tipo cumarínico que  
30 se desea detectar y/o cuantificar. En una segunda etapa del método de detección y/o cuantificación de la invención, se detecta la formación de complejos anticoagulante de tipo cumarínico-anticuerpo que reconoce específicamente el conjugado de la invención, preferentemente un anticuerpo secundario contra el primario marcado mediante una etiqueta detectable.

35

Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de soportes sólidos en los inmunoensayos de la presente invención. Los materiales adecuados para el soporte sólido son sintéticos como poliestireno, cloruro de polivinilo, poliamida u otros polímeros sintéticos, polímeros naturales tales como celulosa, así como polímeros naturales derivados tales como acetato de celulosa o nitrocelulosa, y vidrio, especialmente fibras de vidrio. El soporte puede tomar la forma de esferas, bastones, tubos y placas de microensayo o microtitulación. Las estructuras similares a láminas tales como tiras de papel, placas pequeñas y membranas también son adecuadas. La superficie de los soportes puede ser permeable e impermeable para soluciones acuosas. Soportes sólidos adicionales adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, silicona, cristal, cuarzo, poliimida, acrilato, polimetilmetacrilato, cerámica, nitrocelulosa, metales, carburo de silicio amorfo, poliestireno así como cualquier otro material adecuado para microfabricación o microlitografía. En una realización particular de la invención, el soporte sobre el que se inmoviliza el anticuerpo forma parte de una placa de ensayo.

Los componentes pueden encontrarse inmovilizados al soporte mediante enlaces covalentes o mediante enlaces no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o enlaces iónicos. Una revisión general de micromatrices y de soportes adecuados se ha descrito en Shalon et al. (Genome Research 6: 639-645 (1996), LeGendre (BioTechniques 9: 788-805 (1990), US6197599 y US6140045. Alternativamente, es posible usar soportes activados mediante grupos epoxi, grupos vinil sulfónico, grupos éster activos, grupos aldehído, grupos carboxilo, grupos amino, grupos tiol, grupos isotiocianato y similares. En el caso de que el soporte se encuentre activado mediante grupos epoxi, estos grupos incluyen 3-glisidoxi propil trimetoxi silano (GTMS), 2-(3,4 epoxi ciclohexil)etil trimetoxi silano, 3-glisidoxi propil metil dietoxi silano, 3-glisidoxi propil trietoxi silano y similares.

En general, la detección de la formación de dichos complejos puede realizarse mediante un segundo anticuerpo detectablemente marcado capaz de unirse al anticuerpo inicial, de modo que el soporte se incuba en condiciones suficientes para permitir que el segundo anticuerpo se una a cualquier anticuerpo anti-agente anticoagulante de tipo cumarínico que pueda estar presente. El soporte se trata luego preferiblemente de forma extensa (por ejemplo, lavando) para eliminar sustancialmente cualquier segundo anticuerpo no unido. Si está presente un agente anticoagulante de tipo cumarínico en la muestra en ensayo, los dos anticuerpos (anticuerpo anti-agente anticoagulante de tipo cumarínico y anticuerpo secundario que se une al anticuerpo anterior) formarán un complejo inmune (es decir, un sándwich segundo anticuerpo/agente anticoagulante/anticuerpo anti-agente anticoagulante). En tal ensayo, la

detección del segundo anticuerpo unido al soporte es indicativa de la presencia de agente anticoagulante de tipo cumarínico en la muestra ensayada. El segundo anticuerpo puede ser una inmunoglobulina natural aislada de una especie no humana (por ejemplo, anticuerpo murino anti-IgG, anticuerpo de cabra anti-IgG, anticuerpo de cabra anti-IgM) o se puede producir de forma recombinante o sintética. Puede ser una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina (por ejemplo, FAb, F[Ab]<sub>2</sub>). Según se desee, se pueden emplear otras moléculas de unión junto con o en lugar de tales segundos anticuerpos. Posibles marcajes de un anticuerpo han sido descritos con anterioridad en el contexto del anticuerpo de la invención, y son también aplicables al marcaje de un anticuerpo secundario. Como ejemplo, los anticuerpos anti-agente anticoagulante se pueden biotinilar y el segundo anticuerpo se puede cambiar por avidina o estreptavidina marcada.

La presencia de marcadores enzimáticos se puede detectar mediante el uso de sustratos cromogénicos (incluyendo los que producen o adsorben luz fluorescente, UV, visible) en respuesta a catálisis por el marcador enzimático. Más preferiblemente, se pueden emplear marcadores químicos (por ejemplo, marcadores de oro coloidal, bolas de látex).

La detección del marcador se puede lograr usando múltiples detectores, filtros de varios pasos, rejillas, o flúores espectralmente distintos. Véase Ward D, et al., US 5.759.781. En una realización particular, no limitante, se emplea peroxidasa como un marcador enzimático, en especial junto con el sustrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), OPD o ABTS. En el caso del marcaje de los anticuerpos con peroxidasa como enzima, es posible usar la técnica del peroyodato o un método descrito en el que los compañeros se unen con un reactivo heterobifuncional. Véase Nakane P, et al., J. Histochem. Cytochem. 1974; 22:1084-1090. En una realización particular de la invención, el marcador enzimático es peroxidasa de rábano (HRP).

En una realización del método de detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto, el agente anticoagulante de tipo cumarínico tiene la fórmula (II), en particular se selecciona del grupo formado por warfarina, acenocumarol y fenprocumón. En una realización particular, el agente anticoagulante de tipo cumarínico es acenocumarol. En la detección y/o cuantificación de acenocumarol según una realización particular del método de la invención, se lleva a cabo un ELISA de tipo competitivo. En una realización preferida, el competidor es un conjugado que comprende el antígeno h<sub>ACL</sub> de la invención y una proteína portadora, en donde dicha proteína portadora es preferiblemente HRP.

Tal como se ha comentado anteriormente, pequeñas variaciones en la dosis de un agente anticoagulante administrada a un sujeto en necesidad de tratamiento anticoagulante puede provocar grandes variaciones en el efecto de dicho agente en el sujeto. El tratamiento con  
5 anticoagulantes de tipo cumarínico requiere la monitorización periódica y el seguimiento del efecto del agente en el sujeto, en especial al inicio del tratamiento, de modo que los valores de los parámetros de coagulación se ajusten y se mantengan dentro de los intervalos adecuados. Parámetros clínicos habituales empleados en el análisis de la coagulación del  
10 sujeto comprenden, sin quedar limitados a, el tiempo de protrombina o PT (*Prothrombin Time*), la proporción normalizada internacional o INR (*International Normalized Ratio*) y el tiempo de tromboplastina parcial activada o aPTT (*activated Partial Thromboplastine Time*).

En una realización particular del método de detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico, en particular de detección y/o cuantificación de  
15 warfarina, el antisuero que contiene los anticuerpos específicos que reconocen warfarina es el denominado As233 según la presente invención, y el antígeno competidor empleado en el ELISA es el 4'-amino-ACL (A2) conjugado con BSA.

En una realización particular alternativa del método de detección y/o cuantificación de  
20 agentes anticoagulantes de tipo cumarínico, en particular de detección y/o cuantificación de acenocumarol, el antisuero que contiene los anticuerpos específicos que reconocen acenocumarol es el denominado As236, y el antígeno competidor es h<sub>ACL</sub> conjugado con HRP.

25 En una realización particular del método de detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico de la invención, la muestra procede de un sujeto bajo tratamiento con agentes anticoagulantes de tipo cumarínico. En una realización particular, la muestra se selecciona del grupo formado por sangre, suero o plasma. En una realización preferida, la muestra es de plasma.

30 En el caso de que la muestra del sujeto bajo tratamiento con agentes anticoagulantes de tipo cumarínico sea una muestra de plasma, la detección y/o cuantificación de dichos agentes anticoagulantes en dicha muestra según el método de la invención requiere una etapa de pretratamiento de la muestra, que comprende la desproteización de dicha  
35 muestra. Métodos para la desproteización de una muestra son conocidos por el experto en la materia e incluyen, sin quedar limitados a, precipitación con acetonitrilo, precipitación con

ácido perclórico, precipitación con etanol, desproteización ácida mediante ácido metafosfórico o ácido tricloroacético, así como hidrólisis proteica mediada por enzimas proteolíticos. En una realización particular, la desproteización de la muestra de plasma se lleva a cabo mediante el tratamiento de dicha muestra con etanol.

5

Dado que los conjugados según la presente invención son capaces de inducir la formación de anticuerpos específicos de dichos conjugados, que además reconocen y se unen específicamente a agentes anticoagulantes de tipo cumarínico, tales anticuerpos de acuerdo a la presente invención pueden ser empleados para la cuantificación de agentes  
10 anticoagulantes de tipo cumarínico en la muestra de un sujeto. En una realización particular de la invención, el sujeto está bajo tratamiento con anticoagulantes de tipo cumarínico. Opcionalmente, la muestra se obtiene a partir de dicho sujeto en diferentes puntos de tiempo a lo largo del tratamiento. La determinación de la concentración de agente anticoagulante de tipo cumarínico a lo largo de un tratamiento permite ajustar la dosis de  
15 dicho agente para el tratamiento del sujeto en necesidad de tratamiento anticoagulante. En una realización particular, el sujeto en necesidad de tratamiento anticoagulante padece una patología que requiere de un agente anticoagulante de tipo cumarínico. Un listado no exhaustivo de patologías en las que la coagulación sanguínea está alterada incluye la deficiencia de vitamina K, la coagulación intravascular diseminada (CID), enfermedad de von  
20 Willebrand, hemofilia, trombocitopenia, hepatopatía temprana, hepatopatía terminal, uremia, afibrinogenemia, déficit de factor V, déficit de factor X o púrpura amiloide, enfermedad de Glanzmann y síndrome de Bernard-Soulier.

El método de la invención, por lo tanto, permite realizar un seguimiento de los niveles de  
25 agente anticoagulante de tipo cumarínico a lo largo del tratamiento con dicho agente anticoagulante, permitiendo ajustar la dosis necesaria de agente anticoagulante tanto de modo individualizado a cada sujeto en necesidad de tratamiento, como a lo largo del tiempo en el que es necesaria la aplicación de dicho tratamiento anticoagulante.

30 *Kit para la detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico de la invención*

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit para la detección y/o  
35 cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en la muestra de un sujeto que comprende al menos un componente seleccionado del grupo formado por un anticuerpo



según la invención, un antisuero que comprende un anticuerpo según la invención y un conjugado según la invención.

En una realización particular del kit según la invención, el anticuerpo o el conjugado está  
5 inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como se ha descrito anteriormente.

Un dispositivo contemplado por la presente invención para la cuantificación de anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra y que puede formar parte del kit de la invención es un dispositivo de análisis de diagnóstico inmediato, también conocido como  
10 PoC (point-of-care) o POCT (point-of-care testing) a modo de coagulómetro portátil. Dicho dispositivo comprende al menos un anticuerpo según la invención o un antisuero que comprende un anticuerpo según la invención y/o un conjugado según la invención. La presente invención contempla asimismo el uso de dichos dispositivos en la cuantificación de agentes anticoagulantes en una muestra de un sujeto. Tales dispositivos son de interés en  
15 aplicaciones tales como el ajuste de la dosis de agente anticoagulante de tipo cumarínico para un paciente en necesidad de tratamiento anticoagulante y bajo tratamiento con un anticoagulante de tipo cumarínico. Este tipo de dispositivos permiten realizar pruebas diagnósticas fuera de un laboratorio clínico y por parte de personal no especializado, de modo automatizado y miniaturizado, de modo no invasivo y con un rápido diagnóstico, a  
20 partir de muestras de pequeño volumen y fácil obtención.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en ningún caso como limitativos del alcance de la misma.

25

## EJEMPLO 1

### **Desarrollo de un inmunoensayo de tipo ELISA para la determinación y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en muestras de plasma**

#### 30 1. Materiales y métodos

##### 1.1. Metodología general e instrumentación

La cromatografía en capa fina se realizó en hojas de aluminio F254 de 0,25 mm precubiertas de gel de sílice 60 (Merck, Gibbstown, NJ), y las separaciones de los diferentes compuestos  
35 sintetizados se realizó por cromatografía en columna de sílice con 60 A C.C. 35-70  $\mu\text{m}$  de sodio dodecil sulfato. Los espectros NMR  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron con un Varian Inova-500

(Varian Inc., Palo Alto, CA) espectrómetro (500 MHz para  $^1\text{H}$  y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). La masa exacta fue adquirida utilizando el sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Waters Acquity (UPLC) (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.), utilizando como detector espectrómetro de masas Waters LCT Premier XE tiempo de vuelo modo ESI positivo (+) utilizando como leucina encefalina como compuesto de masa de bloqueo ( $[\text{M} + \text{H}]$  m/z 556.2771). El espectrómetro de masas MALDI-TOF-MS (espectrómetro de masas de ionización por láser asistida por matriz de desorción tiempo de vuelo) que se utiliza para caracterizar los conjugados de proteínas era un Bruker Autoflex III SmartBeam (Bruker-Daltonics, Leipzig, Alemania). La detección se realizó en el modo de ion positivo, ionizada con un conjunto potencia del láser a 70% de la intensidad del láser máximo del instrumento a una frecuencia de 10-100 Hz. El pH y la conductividad de todos los tampones y soluciones se midieron con un pHmetro 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Las placas de microtitulación de poliestireno fueron de Nunc (Maxisorp, Roskilde, Dinamarca). Los pasos de lavado se llevaron a cabo utilizando un Lavador de microplacas SLY96 PW (SLT Labinstruments GmbH, Salzburgo, Austria). Las absorbancias se leyeron en un SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) en un modo de longitud de onda de 450 nm. Las curvas de competición se analizaron con una ecuación de cuatro parámetros utilizando el software SoftmaxPro v4.6 (Molecular Devices) y GraphPad Prism v 4 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). A menos que se indique lo contrario, los datos presentados corresponden a la media de al menos dos replicados. Los inmunoquímico se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Acenocumarol fue adquirido de Ipochem Sp. Z (Varsovia, Polonia). Otros reactivos químicos se adquirieron de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

## 25 1.2. Tampones

PBS es una solución salina al 0,8% de tampón fosfato 10 mM y, a menos que se indique lo contrario, el pH es de 7,5. Tampón de borato es 0,2 M de ácido bórico / borato sódico, pH = 8,7. Tampón de recubrimiento (*coating buffer*) es de 50 mM de carbonato-bicarbonato pH = 9,6. PBST es PBS con 0,05% de Tween 20. Tampón citrato es una solución 40 mM de citrato de sodio pH = 5,5. La solución de sustrato contiene 0,01% de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) y 0,004% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en tampón de citrato.

## 35 1.3. Síntesis de haptenos

2-(((4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-nitrofenil)butano-2-iliden)amino)oxi)acético ( $h_{\text{ACL}}$ )

Se añadió hemihidrocloruro de (carboximetoxil)amina (42,5 mg, 0,19 mmol) a una solución recién preparada de acenocumarol (ACL) (64,1 mg, 0,19 mmol) en 1 N de KOH / EtOH (1 ml), y la mezcla se mantuvo bajo reflujo hasta la completa desaparición del material de partida mediante análisis TLC. Tras el final de la reacción, el material bruto se acidificó con HCl concentrado y el EtOH se eliminó a presión reducida. El sólido obtenido se redisolvió con acetato de etilo (AcOEt) (10 ml), se lavó con HCl 1 N (3 x 5 ml), y se extrajo con NaOH 1 N (3 x 5 ml). La capa acuosa se acidificó con HCl concentrado y se extrajo con AcOEt (3 x 5 ml), y la capa orgánica se lavó con agua (2 x 5 ml), se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida para obtener el hapteno deseado (44 mg, 57% de rendimiento). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 07,10 a 08,03 (8H, m), 4,70 (1H, m, CH), 4,55 (2H, 2 s, CH<sub>2</sub>), 3,45 (1H, m, CH), 3,05 (1H, m), 1,95 (3H, s, CH<sub>3</sub>). HRMS (+ IE) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (M +) 427.1141, encontrado 427.1148.

#### 2 - (((4 - (4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-fenilbutan-2-iliden)amino)oxi)acético (*h<sub>w</sub>*)

15 Siguiendo una estrategia análoga a la descrita anteriormente, warfarina (W) (232 mg, 0,75 mmol) se hizo reaccionar con hemihidrocloruro de (carboximetoxil)amina (164 mg, 0,19 mmol) para obtener el hapteno deseado. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,12-7,77 (9H, m), 4,63 (1H, m, CH), 4,56 (2H, 2 s, CH<sub>2</sub>), 3,44 (1H, m, CH), 3,06 (1H, m), 1,98 (3H, s, CH<sub>3</sub>). HRMS (+ IE) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>6</sub> (M +) 382,1291 encontrado 382.1282.

20

#### 3-(1-(4-aminofenil)-3-oxobutil)-4-hidroxi-2H-cromen-2-ona (4'-amino-ACL, A<sub>2</sub>)

Se siguió un procedimiento adaptado de Fitzpatrick *et al* (Fitzpatrick B & O'Kennedy R 2004 J Immunol Methods 291: 11) con una ligera modificación. ACL (200 mg, 0,79 mmol) se hizo reaccionar con Zn (300 mg) en solución de ácido acético al 30% v / v (5 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente hasta la completa desaparición del material de partida por análisis TLC. El resultante de la reacción se filtró a través de lana de vidrio y se redujo el volumen a 10% del inicial. La solución naranja reducida, se diluyó en AcOEt (10 ml) y se extrajo con HCl 1N (3 x 5 ml). Las fases orgánicas se descartaron y el pH de la fase acuosa se ajustó a pH = 6-7 utilizando NaOH 5N. La capa acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 5 ml), se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida para obtener el producto A<sub>2</sub> naranja (180 mg, 0,62 mmol) con un 78% de rendimiento.

### 1.4. Preparación de conjugados

35 *Inmunógenos*

Los haptenos  $h_{ACL}$  y  $h_W$  se acoplaron a hemocianina de cangrejo herradura (HCH) y albúmina de suero bovino (BSA), siguiendo el método del anhídrido mixto descrito por Salvador *et al.* (Salvador JP *et al.* 2007 Anal Chem 79: 3734). Brevemente, el ácido carboxílico de  $h_{ACL}$  y  $h_W$  (10  $\mu\text{mol}$ ) se activaron con cloroformato de isobutilo (14  $\mu\text{mol}$ ) en presencia de tributilamina (12  $\mu\text{mol}$ , respectivamente) en DMF (dimetilformamida, 200  $\mu\text{l}$ ) y se añadió a una solución de la proteína (10 mg) en tampón de borato (1,8 ml). Los espectros MALDI-TOF-MS se obtuvieron mediante la mezcla de 2  $\mu\text{l}$  de la matriz (ácido *trans*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico, 10 mg  $\text{ml}^{-1}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  50:50, 0,1% de ácido fórmico) con 2  $\mu\text{l}$  de una solución de los conjugados o de proteínas (5 mg  $\text{ml}^{-1}$  en agua MilliQ). Las densidades de hapteno obtenidos fueron alrededor de 5 y 8 para  $h_{ACL}$ -BSA y  $h_W$ -BSA, respectivamente.

#### Competidores

Método del éster activo: Los haptenos  $h_{ACL}$  y  $h_W$  (2  $\mu\text{mol}$ ) se hicieron reaccionar con N-hidroxisuccinimida (NHS, 1,15 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) y dicitclohexilcarbodiimida (4,12 mg, 20  $\mu\text{mol}$ ) en 200  $\mu\text{l}$  de anhidro DMF y se añaden a seroalbúmina bovina (BSA, 10 mg), ovoalbúmina (OVA, 10 mg) y conalbúmina (CONA, 10 mg) en tampón borato (1,8 ml). La conjugación de los haptenos  $h_{ACL}$  y  $h_W$  con HRP se realizó mediante la adición de 10  $\mu\text{mol}$  de cada hapteno activado con el mismo exceso molar de NHS (2,87 mg, 25  $\mu\text{mol}$ ) y DCC (10,3 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) a HRP (2 mg) en tampón borato. Los conjugados se purificaron por diálisis y se almacenaron liofilizados a  $-80^\circ\text{C}$ . Se prepararon alícuotas de trabajo a 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  en PBS y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$ . La caracterización de los conjugados de proteínas se realizó por MALDI-TOF-MS como se describió anteriormente. Las densidades de hapteno obtenidas fueron alrededor de 1, 8, 2 y 7 para los conjugados de  $h_{ACL}$  y HRP, BSA, OVA y CONA, respectivamente, y de 1, 9, 2 y 9 para los conjugados de  $h_W$  y HRP, BSA, OVA y CONA, respectivamente. Acoplamiento con diazonio: el acoplamiento se realizó a BSA con 4' amino-ACL según el procedimiento descrito por Fitzpatrick *et al.* (Fitzpatrick B & O'Kennedy R 2004 J Immunol Methods 291: 11), modificado ligeramente. La conjugación a BSA se realizó disolviendo 13,24 mg de  $A_2$  (40  $\mu\text{mol}$ ) en 2 ml de una solución que contenía 0,1 M de HCl y 7 mM de KBr, con agitación en un baño de hielo. Se añadieron 0,4 ml de solución 1,4 mM de  $\text{NaNO}_2$  gota a gota y se agitó en un baño de hielo durante 1 h. La solución activada se añadió entonces gota a gota a 20 mg de BSA disuelta en 2 ml de tampón carbonato a pH 9,6. La conjugación se agitó durante la noche a  $4^\circ\text{C}$ . La solución marrón se purificó por diálisis y se almacenó liofilizada a  $-80^\circ\text{C}$ . Se prepararon alícuotas de trabajo de 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  en PBS y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$ . La caracterización de los conjugados de proteínas se

realizó por MALDI-TOF-MS como se describió anteriormente. La densidad de hapteno obtenido fue alrededor de 2 para A<sub>2</sub>-BSA.

#### 1.5. Producción de anticuerpos policlonales

5 Tres conejos hembra blancos New Zealand de 1-2 kg de peso fueron inmunizados para cada inmunógeno, h<sub>W</sub>-HCH y el h<sub>ACL</sub>-HCH, siguiendo el protocolo de inmunización descrito en Salvador JP *et al.* 2010 J Chromatogr 878: 243. La evolución de los títulos de anticuerpos se evaluó mediante la medición de la unión de diluciones seriadas de **cada**  
**antisuero** a placas de microtitulación **tapizadas** con el conjugado de BSA homólogo. Tras  
 10 obtener un título de anticuerpo aceptable, los animales fueron desangrados y la sangre se recogió en tubos vacutainer provistos con un gel de separación de suero. El antisuero se obtuvo por centrifugación y se almacenó a -40 °C en presencia de 0,02% NaN<sub>3</sub>.

#### 1.6 Rastreo antígeno-anticuerpo

15 Los anticuerpos obtenidos por inmunización de h<sub>ACL</sub>-HCH (As236-238) y de h<sub>W</sub>-HCH (As233-235) fueron evaluados frente a diferentes los diferentes antígenos producidos A2-BSA, hACL y hW unidos a BSA, OVA, CONA y HRP. La evaluación se realizó en formato ELISA no competitivo.

20

#### 1.7. ELISA competitivo

Las diluciones apropiadas de los antisueros y del **trazador enzimático** y/o antígeno de recubrimiento de las combinaciones anteriormente mencionadas se estableció después de llevar a cabo ensayos de titulación bidimensionales tal como se describe en Salvador JP *et al.* (Salvador JP *et al.* 2008 Anal Chem 376: 211). Las mejores combinaciones son las  
 25 obtenidas a continuación:

##### *ELISA para la determinación de warfarina: A2-BSA/As233*

Las placas de microtitulación se tapizaron **con** A<sub>2</sub>-BSA (0,062 µg ml<sup>-1</sup> cubiertas en tampón  
 30 de recubrimiento (100 µl/pocillo) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas fueron lavadas cuatro veces con PBST antes de añadir las muestras, estándares o reactivos cruzados, a diferentes concentraciones (50 µl/pocillo), seguido por la solución del antisuero As233 (dilución 1/4000 en PBST, 50 µl/pocillo). Después de 30 min a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo cuatro veces con PBST y se añadió la solución anti-IgG-HRP  
 35 (1/6000 en PBST, 100 µl/pocillo) Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, las microplacas se lavaron de nuevo cuatro veces con PBST y se añadió la solución de

sustrato (100 µl/pocillo) y la reacción enzimática se detuvo después de 30 min a temperatura ambiente mediante H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (50 µl/pocillo). Las absorbancias se midieron a 450 nm. La curva patrón se ajustó a una ecuación logística de cuatro parámetros según la fórmula  $y = (A-B / [1 - (x / C)^D]) + B$ , donde A es la absorbancia máxima, B es la absorbancia mínima, C es la concentración que produce el 50% de la diferencia entre la absorbancia máxima y mínima de la absorbancia (o IC<sub>50</sub>), y D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea. El límite de detección (LOD) se define como la concentración que da el 90% de respuesta de la absorbancia máxima (IC<sub>90</sub>).

#### 10 *ELISA para la determinación de acenocumarol: As236 / h<sub>ACL</sub>-HRP*

Las placas de microtitulación se recubrieron con el antisuero As236 (1/32000 de dilución en tampón de recubrimiento 100 µl/pocillo) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se procesaron tal como se ha descrito anteriormente mediante la adición de las muestras o de los estándares (en PBST, 50 µl/pocillo) seguido por el trazador enzimático H<sub>ACL</sub>-HRP (0,01 µl/pocillo en PBST, 50 µl/pocillo). Después de 30 min a temperatura ambiente, las microplacas se lavaron de nuevo cuatro veces con PBST. La solución sustrato se añadió como se describió anteriormente.

#### 1.8. Determinaciones de reactividad cruzada

20 Se prepararon soluciones stock de los diferentes compuestos (10 mM en dimetilsulfóxido) y se almacenaron a 4 °C. Las curvas de calibración se prepararon en el mismo tampón para cada formato ELISA en el mismo rango que se hizo la curva, y cada IC<sub>50</sub> se determinó en el experimento de competición descrito anteriormente. Los valores de reactividad cruzada se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:  $(IC_{50} \text{ ACL o W} / IC_{50}) \times 100$ .

25

#### 1.9. Muestras de plasma

Se obtuvo un *pool* de plasma humano a partir de la mezcla de las muestras de seis personas. El *pool* de plasma fue utilizado para los estudios del efecto de la matriz, la evaluación del pretratamiento de plasma y estudios de precisión. Las muestras de plasma de pacientes no tratados y tratados fueron aportadas amablemente por el doctor D. Tassies y el doctor JC Reverter del grupo de hemoterapia-hemostasia del IDIBAPS del Hospital Clínic de Barcelona. Las muestras no tratadas eran de 48 personas sanas y las muestras tratadas fueron tomadas de 48 pacientes tratados con ACL con un valor de INR estable en los dos últimos ensayos.

35

#### 1.10. Pretratamiento de plasma

Antes del ELISA, las proteínas se precipitaron mediante la adición de etanol a una concentración de 50%, agitando durante 15 minutos y centrifugando para separar el precipitado. Las muestras se diluyeron con PBS a 10% de etanol y la cantidad necesaria de Tween 20 se añadió hasta alcanzar una concentración del 0,05%. Diluciones adicionales se realizaron con 10% de etanol-PBST 0,05% de Tween 20.

#### 1.11. Estudios de los efectos de la matriz

Las muestras de plasma (con o sin tratamiento) se diluyeron en el tampón de ensayo y se usa para preparar las curvas patrón. El efecto de la matriz se evaluó comparando el paralelismo de las curvas patrón con la curva preparada utilizando el tampón de ensayo.

#### 1.12. Estudios de precisión

Este parámetro se evaluó mediante la preparación de 6 muestras fortificadas ciegas (*blind spiked samples*) diferentes y su medición sin dilución mediante ELISA. Las medidas se realizaron por duplicado y utilizando como curva patrón una dilución apropiada del analito en el plasma.

#### 1.13. Mediciones en muestras de pacientes tratados (PS-1-48) y pacientes no tratados (PS-50-98)

Cada medición se realizó por triplicado en tres días diferentes.

## 2. Resultados

### 2.1. Síntesis de haptenos

La elección del brazo espaciador es de gran importancia en la producción de anticuerpos con sensibilidad. En este caso, se seleccionó el carboximetoxiloxima como brazo espaciador para la producción de anticuerpos contra anticoagulantes de tipo cumarínico, el cual es capaz de unir a la proteína inmunogénica con el fin de estimular el sistema inmune, sin alterar las principales propiedades físico-químicas del analito objetivo. Este tipo de brazo espaciador mantiene dos de los principales epítomos de los anticoagulantes de interés. Se ha analizado la síntesis de dos haptenos diferentes,  $h_W$  y  $h_{ACL}$ , para la detección de los anticoagulantes de tipo cumarínico.

El primer hapteno,  $h_{ACL}$ , fue diseñado con la finalidad de producir anticuerpos selectivos de acenocumarol, conservando los epítomos característicos tales como 4-hidroxi-cumarina y anillos 4'-nitro-fenilo. Por otro lado, el segundo hapteno  $h_W$  da lugar a anticuerpos con igual

reconocimiento de la warfarina y fenprocumón debido a la conservación de los mismos epitotos (4-hidroxi-cumarina y anillos de fenilo). La síntesis de los haptenos se ha llevado a cabo con buenos rendimientos, siendo purificados y caracterizados mediante carboximetoxilamina en condiciones básicas.

5

### 2.2. Conjugación de haptenos

El método de conjugación seleccionado para la preparación de los inmunógenos fue el del anhídrido mixto. Este método proporciona el acoplamiento del grupo carboxílico del hapteno con las lisinas libres accesibles de la proteína, reduciendo al mínimo los subproductos de conjugación. El acoplamiento se realizó en HCH y BSA en paralelo. Los conjugados con BSA fueron utilizados como control de la unión entre hapteno y proteína. Los resultados obtenidos mostraron que  $h_{ACL}$  y  $h_W$  tienen una densidad de hapteno 5 y 8, respectivamente. Por lo tanto, se asumió que el acoplamiento entre el hapteno y el HCH se produjo con éxito. El hapteno conjugado  $h_W$ -HCH fue utilizado como un inmunógeno para generar anticuerpos policlonales denominados As233, As234 y As235. De la misma manera, el conjugado  $h_{ACL}$ -HCH se inoculó para obtener anticuerpos policlonales denominados As236, As237 y As238. Los competidores para el desarrollo del correspondiente ELISA se prepararon utilizando el método del éster activo para  $h_{ACL}$  y  $h_W$  a BSA, OVA, CONA y HRP. Otro competidor de interés 4'amino-acenocumarol se utilizó como hapteno unido a BSA. La reducción de ACL y la posterior unión a BSA se realizó usando el método anteriormente mencionado de Fitzpatrick et al. (Fitzpatrick B & O'Kennedy R 2004 J Immunol Methods 291: 11) con buenos resultados, obteniéndose un hapteno de densidad 2.

### 2.3. Selección de anticuerpos

La avidéz de los anticuerpos obtenidos se ha probado con todos los conjugados de proteínas en un ELISA no competitivo. Se probó un total de 48 combinaciones en formato indirecto (seis antisueros por ocho antígenos de recubrimiento) y 12 combinaciones en formato directo (seis antisueros por dos marcadores enzimáticos). Después de un primer análisis de todas las combinaciones, tres obtuvieron tres combinaciones con una buena detección para la determinación de W (A2-BSA/As233) y ACL (As236 / HACL-HRP). Las curvas patrón se muestran en la figura 2 y los parámetros característicos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros característicos

	<b>A2BSA/As233</b>	<b>As236/hACL-HRP</b>
<b>Amax</b>	1.500±0.155	1.316±0.116



<b>Amin</b>	0.097±0.012	0.054±0.005
<b>Pendiente</b>	-1.327±0.037	-0.940±0.068
<b>IC<sub>50</sub></b>	3.52±2.25	2.66±0.74
<b>WR</b>	1.194±0.732/12.05±2.99	0.636±0.205/10.19±6.69
<b>LOD</b>	0.621±0.369	0.276±0.098
<b>R<sup>2</sup></b>	0.997±0.001	0.996±0.002

Con el fin de caracterizar los ensayos seleccionados, la estudió selectividad de cada ensayo (Tabla 2).

5

Tabla 2. Selectividad de los ensayos

	<b>A<sub>2</sub>BSA/As233</b>		<b>As236/h<sub>ACL</sub>-HRP</b>	
	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>%CR</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>%CR</b>
<b>Acenocumarol (ACL)</b>	4.35	84	2.66	100
<b>Warfarina (W)</b>	3.67	100	0.82	326
<b>4'-Amino-ACL (4'-NH<sub>2</sub>-ACL)</b>	46.88	8	5.02	53
<b>4-hidroxi-cumarina (4OH-COU)</b>	2000	<0.18	285	1
<b>Testosterona (T)</b>	2000	<0.18	2000	<0.13
<b>Cloranfenicol (CAP)</b>	2000	<0.18	2000	<0.13

Como resultados de este estudio, el mejor reconocimiento de W de la ACL por el anticuerpo As236, originado contra ACL, fue inesperado. Una explicación de este comportamiento podría ser que el epítipo principal que ha generado anticuerpos fue el 4-hidroxi-cumarina (4-OH-CO). Este hecho se evidenció también por el hecho de que este epítipo se reconoció mal en los ensayos, pero suficientemente para asegurar que el 4-hidroxycumarina es la parte más inmunogénica de la molécula para producir anticuerpos. El reconocimiento de 4'-amino-ACL, que conserva este epítipo, es también un hecho que demuestra que el epítipo principal es la 4-OH-CO. Este hecho se puede tomar en ventaja debido a que este compuesto es uno de los principales metabolitos de acenocumarol. El otro epítipo principal que podría desempeñar un papel importante es el grupo 4'-nitrofenil. El hecho de que el cloranfenicol no se reconoció avala la teoría de que no se generan anticuerpos contra este epítipo.

#### 20 2.4. Condiciones de ensayo en muestras de plasma

El tiempo de protrombina (PT) y valor INR es el tiempo en el que se obtiene el plasma por coagulación de la sangre mediante adición de un agente coagulante (principalmente citrato).

Por lo tanto, el plasma se obtiene durante el proceso de coagulación. Debido al hecho de que el plasma es resultante de la prueba de coagulación, los inmunoensayos para ACL y W se ensayaron utilizando el plasma como matriz. El pool de plasma humano se utilizó como blanco para evaluar las interferencias no específicas que se pudieran dar en el ELISA. La figura 2 muestra que en el formato indirecto A2-BSA/As233 tiene que ser diluido 25 veces para alcanzar los mismos parámetros de ajuste que en tampón.

Por lo tanto, la buena detectabilidad lograda en las condiciones tamponadoras empeora cuando el plasma se utiliza para la determinación de anticoagulantes, haciendo que no sea capaz de llegar a la concentración que se encuentra en plasma. Como se puede observar en la Tabla 3, que muestra el LOD, WR (en términos de IC<sub>80</sub> y IC<sub>20</sub>) e IC<sub>50</sub> (corregida teniendo en cuenta el factor de dedilución (*desdilution factor*) correspondiente, la detectabilidad lograda no es suficiente debido al hecho de que es necesario diluir 25 veces el plasma para alcanzar los mismos parámetros que en tampón. Sin embargo, el ensayo As236/hACL-HRP no está fuertemente afectado por el plasma en términos de Amax, pero el parámetro IC50 se ve afectado. A pesar de este comportamiento, se puede considerar la curva patrón de ACL en un pool de plasma, alcanzando una mejor detectabilidad en 1,56 nM.

20

Tabla 3

		Plasma 1/1	Plasma 1/2	Plasma 1/5	Plasma 1/10	Plasma 1/25	Buffer
<b>As236/h<sub>ACL</sub>-HRP</b>	<b>LOD</b>	1.56	3.21	4.36	10.86	9.73	0.31
	<b>IC<sub>80</sub></b>	5.35	8.31	11.08	23.73	21.54	0.67
	<b>IC<sub>50</sub></b>	28.99	37.66	56.61	84.98	80.04	2.69
	<b>IC<sub>20</sub></b>	135.47	161.89	280.30	305.94	301.81	11.12
	<b>Amax</b>	0.91	1.06	1.18	1.11	1.13	1.20
<b>A<sub>2</sub>-BSA/As233</b>	<b>LOD</b>	3.12	3.72	4.89	4.11	4.02	0.19
	<b>IC<sub>80</sub></b>	8.47	8.27	10.42	9.99	7.76	0.37
	<b>IC<sub>50</sub></b>	39.18	30.71	36.14	36.92	24.73	1.11
	<b>IC<sub>20</sub></b>	160.07	110.87	123.8	128.41	80.50	3.24
	<b>Amax</b>	0.70	0.84	1.02	1.02	1.23	1.30

Además, puede ser conveniente un procedimiento de lavado para minimizar las interferencias no específicas a partir de plasma y mejorar la detectabilidad en el plasma. La experiencia previa de los inventores indica que la perturbación de matriz a partir de plasma se puede encontrar en la presencia de proteínas en la sangre. Por lo tanto, eliminando el contenido de proteínas en el plasma, el efecto de la matriz se pueden evitar, mejorando también la detectabilidad. La adición de EtOH al plasma es la forma más sencilla de desproteinizas dichas muestras de plasma, por lo que este método se analizó para los ensayos en desarrollo. En ambos ensayos, las interferencias de la matriz de plasma se minimizaron utilizando esta metodología, tal como se puede observar en la figura 4. Es esta figura se observa que el efecto de la matriz se evita mediante el uso de EtOH como agente de desproteinización, pero no afecta a los parámetros de calibrado característicos de la curva patrón para As236/hACL-HRP (ver Tabla 4).

Tabla 4

	<b>As236/hACL-HRP</b>		<b>A2BSA/As233</b>	
	<b>ACL</b>		<b>W</b>	
	<b>PBST 10% EtOH</b>	<b>Plasma tratado</b>	<b>PBST 10% EtOH</b>	<b>Plasma tratado</b>
<b>Amax</b>	1.004	0.9553	0.9167	0.9989
<b>Amin</b>	0.043	0.05018	0.1094	0.06488
<b>Pendiente</b>	-0.807	-0.9178	-1.026	-1.044
<b>IC<sub>50</sub></b>	5.38	6.38 (63.83)	3.557	12.20
<b>WR</b>	0.89/28.41	1.34/28.91 (13.4/289.1)	0.87/13.70	3.23/44.60
<b>LOD</b>	0.30	0.52 (5.2)	0.37	1.50
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9906	0.9963	0.9952	0.9937

Sin embargo, considerando el proceso y la dilución requerida para medir mediante este ensayo, el límite de detección (LOD) alcanzado es de 5,2 nM. La recuperación observada de ACL con este tratamiento se calculó en el  $99,8 \pm 3,5\%$ . En cuanto al ensayo A2BSA/As233, el efecto de la matriz se minimizó, sin embargo la detectabilidad fue para la detección de W, con un IC<sub>50</sub> en PBST a 10% de EtOH que pasa de 3,55 nM a 12,20 nM. Una explicación de este comportamiento es que W no se recuperó por completo a partir del plasma, se encontró en  $39 \pm 12,7\%$ .

## 2.5. ELISA

Así, de acuerdo con los resultados obtenidos de los estudios sobre los efectos de plasma, se realizó un estudio de precisión (*accuracy study*) con muestras fortificadas ciegas de plasma y fueron medidas con el ensayo de As236/hACL-HRP con y sin tratamiento con EtOH para ACL, así como con A2BSA/As233 para W. Tal como se muestra en la Figura 5, observó una buena correlación entre las muestras medidas y las muestras (muestras fortificadas) para la detección ACL, siendo factible medir directamente en el plasma (pendiente =  $1,00 \pm 0,08$ , oo (ordenada en el origen) =  $5,81 \pm 3,77$  y  $r^2 = 0,906$ ). o con un solo tratamiento (pendiente =  $1,11 \pm 0,04$ , oo =  $-1,04 \pm 3,79$  y  $r^2 = 0,989$ ). En el caso de detección de W, no se realizó el estudio de precisión en el plasma directamente, debido a la baja detectabilidad observada. En cambio, el estudio de precisión se hizo utilizando la desproteización mediante EtOH. Por lo tanto, con el fin de minimizar la baja recuperación observada, la curva patrón se realizó utilizando el mismo protocolo que en el plasma con tratamiento de EtOH. Así, se observó una buena correlación en la medición de las muestras y muestras fortificadas (pendiente =  $0,75 \pm 0,03$ , oo =  $3,92 \pm 2,00$  y  $r^2 = 0,974$ ).

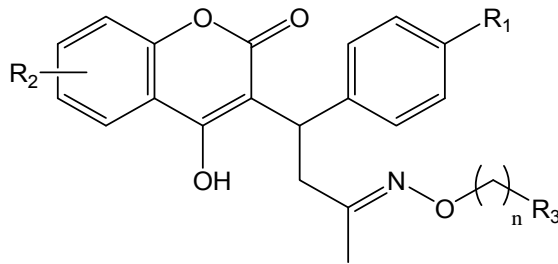
A fin de demostrar la capacidad de utilizar el ELISA para la determinación de los anticoagulantes, muestras reales de pacientes tratados con acenocumarol se analizaron con As236/hACL-HRP, debido a que es el principal fármaco anticoagulante empleado en la Europa continental. Sin embargo, antes de analizar los pacientes tratados, se seleccionaron pacientes control con el fin de evaluar la variabilidad inter-persona con el ELISA desarrollado en la invención. Los resultados se muestran en la Figura 6. La mayoría de las muestras se consideran no tratadas usando como valor de corte (cut-off value) de absorbancia el correspondiente a IC80, utilizando como plasma de referencia un pool de plasma. Sólo tres pacientes fueron considerados como un falso positivo, lo que representa un 6,25% del total de pacientes.

Con respecto a las mediciones de los pacientes tratados, la figura 6 muestra que el ELISA es capaz de detectar diferentes concentraciones de acenocumarol en el plasma; todos los valores encontrados estaban dentro del rango de trabajo del ELISA. En esta figura, se puede observar la gran heterogeneidad en la concentración que se encuentra para cada paciente. Una explicación para este comportamiento es debido al perfil de genotipo de cada paciente. Como se sabe, los anticoagulantes dependen de varios factores incluyendo la edad, la dieta y las isoformas genéticas. A pesar de la dispersión de los resultados, este hecho revela la utilidad del ELISA desarrollado en la presente invención para la determinación de acenocumarol en pacientes tratados con este anticoagulante de tipo cumarínico.

**REIVINDICACIONES**

1. Un hapteno de fórmula (I):

5



(I)

donde

10

$R_1$  se selecciona entre H,  $NO_2$ ,  $NH_2$ , halógeno, OH,  $O-C_{1-4}$  alquilo,  $NHCOCH_3$ ,  $CF_3$  y  $OCF_3$ ;

$R_2$  se selecciona entre halógeno, OH,  $C_{1-4}$  alquilo y  $O-C_{1-4}$  alquilo;

n es un número entero entre 1 y 6; y

$R_3$  se selecciona entre  $COOH$ ,  $CHO$ , halógeno,  $NH_2$ ,  $N_3$ ,  $C\equiv CH$ , OH y SH.

15

2. Hapteno de fórmula (I) donde  $R_1$  se selecciona entre H y  $NO_2$ .

3. Hapteno según reivindicaciones 1 ó 2, donde  $R_2$  es H.

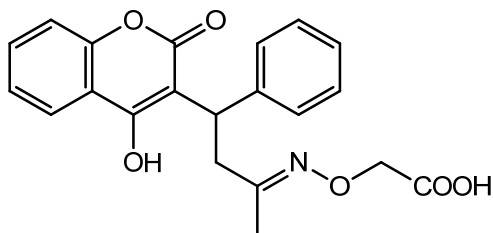
20

4. Hapteno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde  $R_3$  es  $COOH$ .

5. Hapteno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde n es 1.

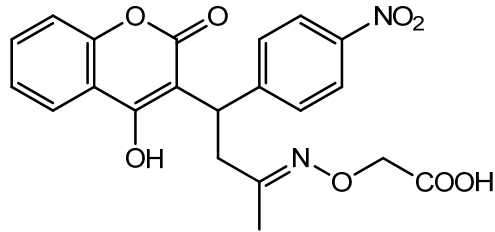
6. Hapteno según reivindicación 1, donde  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $n=1$  y  $R_3=COOH$  con fórmula (Ia):

25



(Ia)

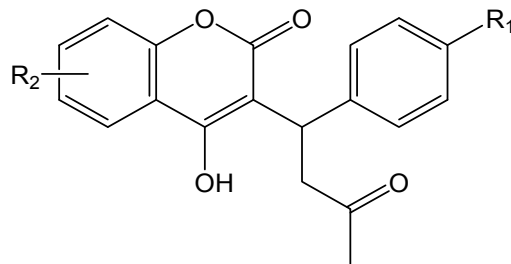
7. Hapteno según reivindicación 1, donde  $R_1=NO_2$ ,  $R_2=H$ ,  $n=1$  y  $R_3=COOH$  con fórmula (Ib):



5

(Ib)

8. Un procedimiento para la preparación de un hapteno según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende hacer reaccionar un agente anticoagulante de tipo cumarínico de fórmula (II):



10

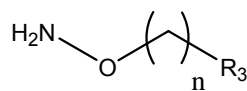
(II)

donde

$R_1$  se selecciona entre H,  $NO_2$ ,  $NH_2$ , halógeno, OH, O- $C_{1-4}$  alquilo,  $NHCOCH_3$ ,  $CF_3$  y  $OCF_3$ ;

$R_2$  se selecciona entre halógeno, OH,  $C_{1-4}$  alquilo y O- $C_{1-4}$  alquilo;

con un compuesto de fórmula (III):



(III)

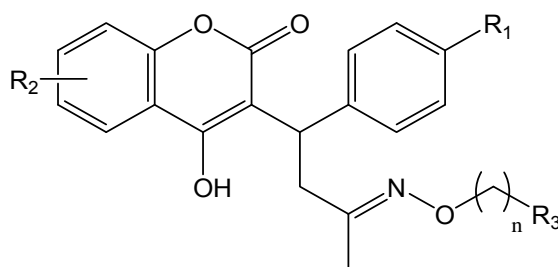
20

donde

$n$  es un número entero entre 1 y 6; y

$R_3$  se selecciona entre  $COOH$ ,  $CHO$ , halógeno,  $NH_2$ ,  $N_3$ ,  $C\equiv CH$ , OH y SH.

9. Procedimiento según reivindicación 8, en donde el agente anticoagulante de fórmula (II) tiene  $R_1=R_2=H$ , el compuesto de fórmula (III) tiene  $R_3=COOH$  y  $n=1$ , y el hapteno obtenido es un hapteno de fórmula (I) donde  $R_1=R_2=H$ ,  $R_3=COOH$  y  $n=1$ .
- 5 10. Procedimiento según reivindicación 8, en donde el agente anticoagulante de fórmula (II) tiene  $R_1=NO_2$  y  $R_2=H$ , el compuesto de fórmula (III) tiene  $R_3=COOH$  y  $n=1$  y el hapteno obtenido es un hapteno de fórmula (I) donde  $R_1=NO_2$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=COOH$  y  $n=1$ .
- 10 11. Un conjugado que comprende un hapteno y un segundo componente seleccionado del grupo formado por a) una proteína portadora o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad, b) un oligonucleótido, c) una etiqueta detectable, y d) un polímero o un soporte inorgánico, en donde el hapteno tiene la fórmula (I)



(I)

donde

$R_1$  se selecciona entre H,  $NO_2$ ,  $NH_2$ , halógeno, OH, O-C1-4 alquilo,  $NHCOCH_3$ ,  $CF_3$  y  $OCF_3$ ;

$R_2$  se selecciona entre halógeno, OH, C1-4 alquilo y O-C1-4 alquilo;

$n$  es un número entero entre 1 y 6.

$R_3$  se selecciona entre  $COOH$ ,  $CHO$ , halógeno,  $NH_2$ ,  $N_3$ ,  $C\equiv CH$ , OH y SH.

- 25 12. Conjugado según la reivindicación 11, en donde la proteína portadora se selecciona del grupo formado por hemocianina de cangrejo herradura (HCH), albumina de suero bovino (BSA), peroxidasa de rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA) y conalbúmina (CONA).
- 30 13. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, que comprende un hapteno de fórmula (I) donde  $R_1=R_2=H$ ,  $R_3=COOH$  y  $n=1$ .

14. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, que comprende un hapteno de fórmula (I) donde  $R_1=NO_2$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=COOH$  y  $n=1$ .
- 5 15. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en donde el hapteno y la proteína portadora están unidos directamente entre sí mediante un enlace covalente resultante de la reacción entre el grupo carboxílico del hapteno y el grupo amino de la proteína.
- 10 16. Un procedimiento para la preparación de un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende la activación del ácido carboxílico del hapteno y la reacción del hapteno activado con una proteína.
- 15 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en donde la activación del ácido carboxílico es mediada por un cloroformato de alquilo, por carbodiimida o por un éster de N-hidroxisuccinimida.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, en donde el cloroformato de alquilo es el isobutilcloroformato.
- 20 19. Un anticuerpo que reconoce específicamente un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.
20. Anticuerpo según la reivindicación 19 que, adicionalmente, reconoce un agente anticoagulante de tipo cumarínico.
- 25 21. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 19 ó 20 que comprende una etiqueta detectable.
22. Un antisuero que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21.
- 30 23. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 o de un antisuero según la reivindicación 22 o de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en la detección y/o cuantificación de anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto.
- 35



24. Uso según la reivindicación 23, en donde el sujeto está bajo tratamiento con anticoagulantes de tipo cumarínico.
- 5 25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24, en donde los anticoagulantes se seleccionan del grupo formado por warfarina, acenocumarol y fenprocumón.
26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde la muestra del sujeto es una muestra de plasma.
- 10 27. Método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto que comprende:
- 15 (i) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 o con un antisuero según la reivindicación 22 o con un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, y
- (ii) detectar la formación de complejos anticoagulantes de tipo cumarínico-anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21.
28. Método según la reivindicación 27, en donde el sujeto está bajo tratamiento con anticoagulantes de tipo cumarínico.
- 20 29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 27 ó 28, en donde la muestra del sujeto es una muestra de plasma.
- 25 30. Método según la reivindicación 29, en donde la muestra de plasma es sometida a desproteización.
31. Método según la reivindicación 30, en donde la desproteización se realiza mediante precipitación con etanol.
- 30 32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en donde los anticoagulantes se seleccionan del grupo formado por warfarina, acenocumarol y fenprocumón.
- 35 33. Método según la reivindicación 32, en donde el agente anticoagulante es acenocumarol.

34. Método según la reivindicación 32, en donde el agente anticoagulantes es warfarina.
- 5 35. Un kit para la detección y o cuantificación de agentes anticoagulantes de tipo cumarínico en una muestra de un sujeto que comprende al menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, un antisuero según la reivindicación 22. o un conjugado según cualquiera de las reivindicación 11 a 15.
- 10 36. Kit según la reivindicación 35 en donde el anticuerpo está inmovilizado sobre un soporte sólido.
37. Kit según la reivindicación 35 en donde el conjugado está inmovilizado sobre un soporte sólido.

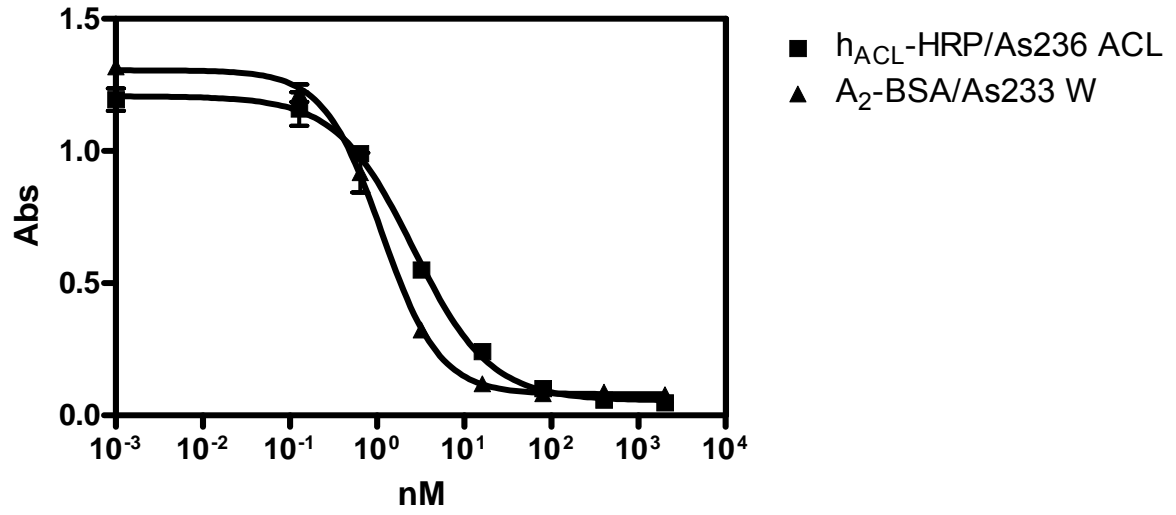


FIG. 1

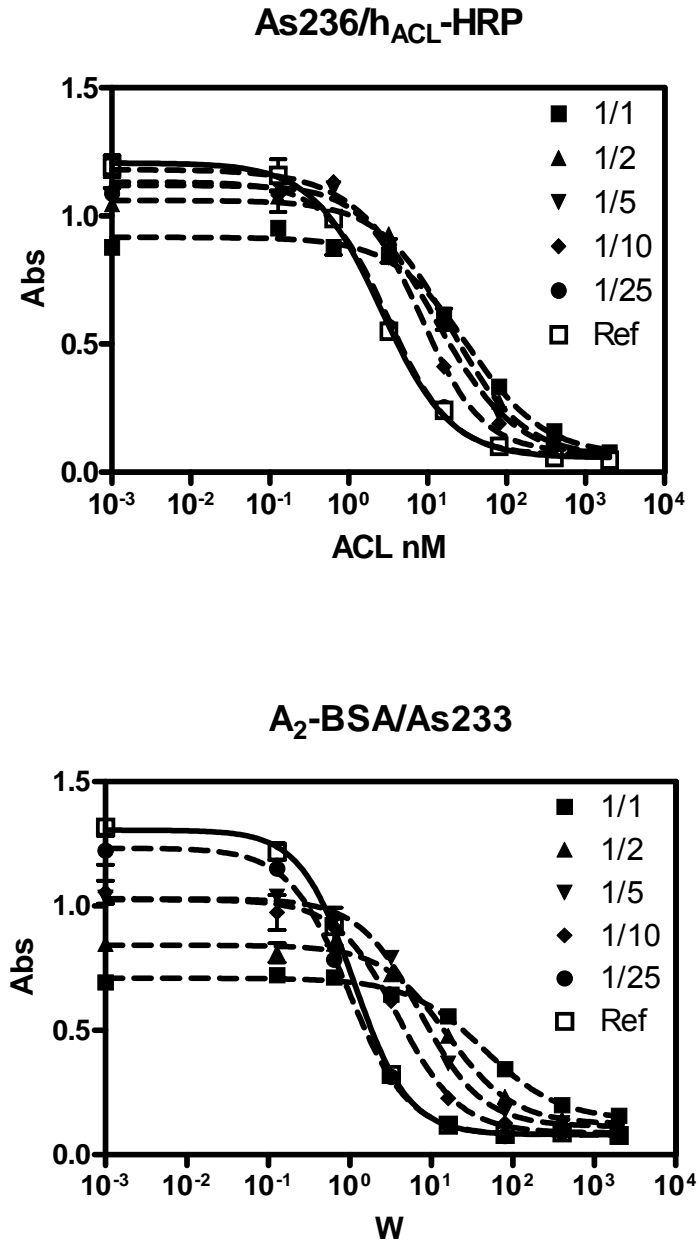
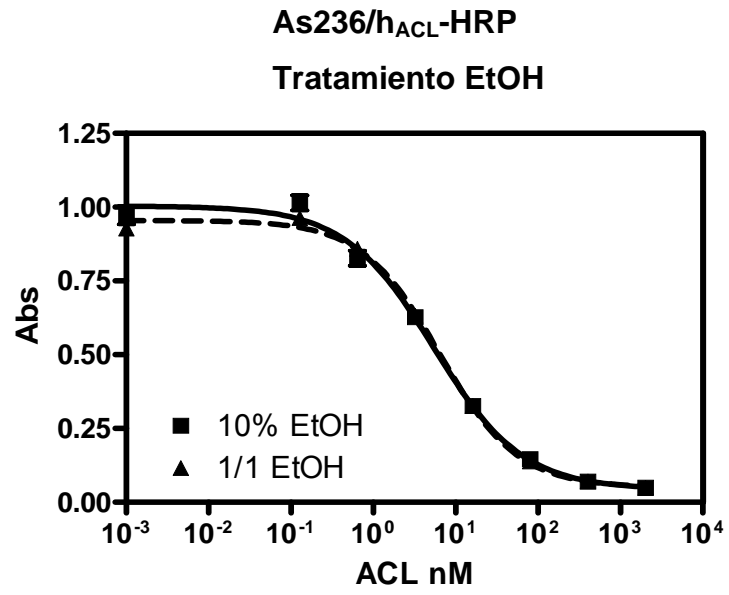


FIG. 2



**FIG. 3**

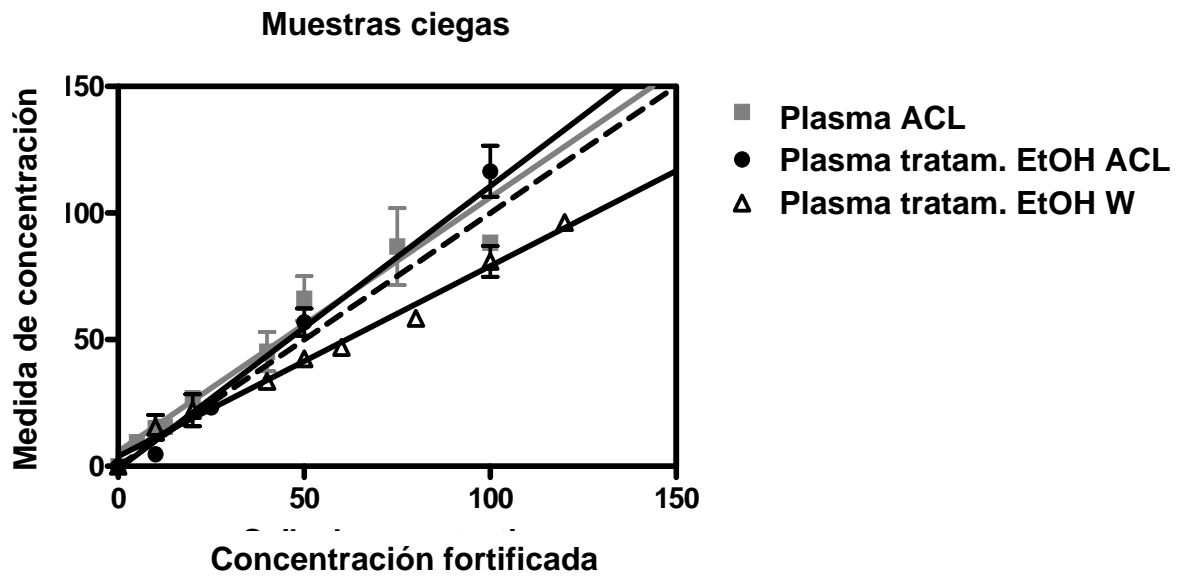


FIG. 4

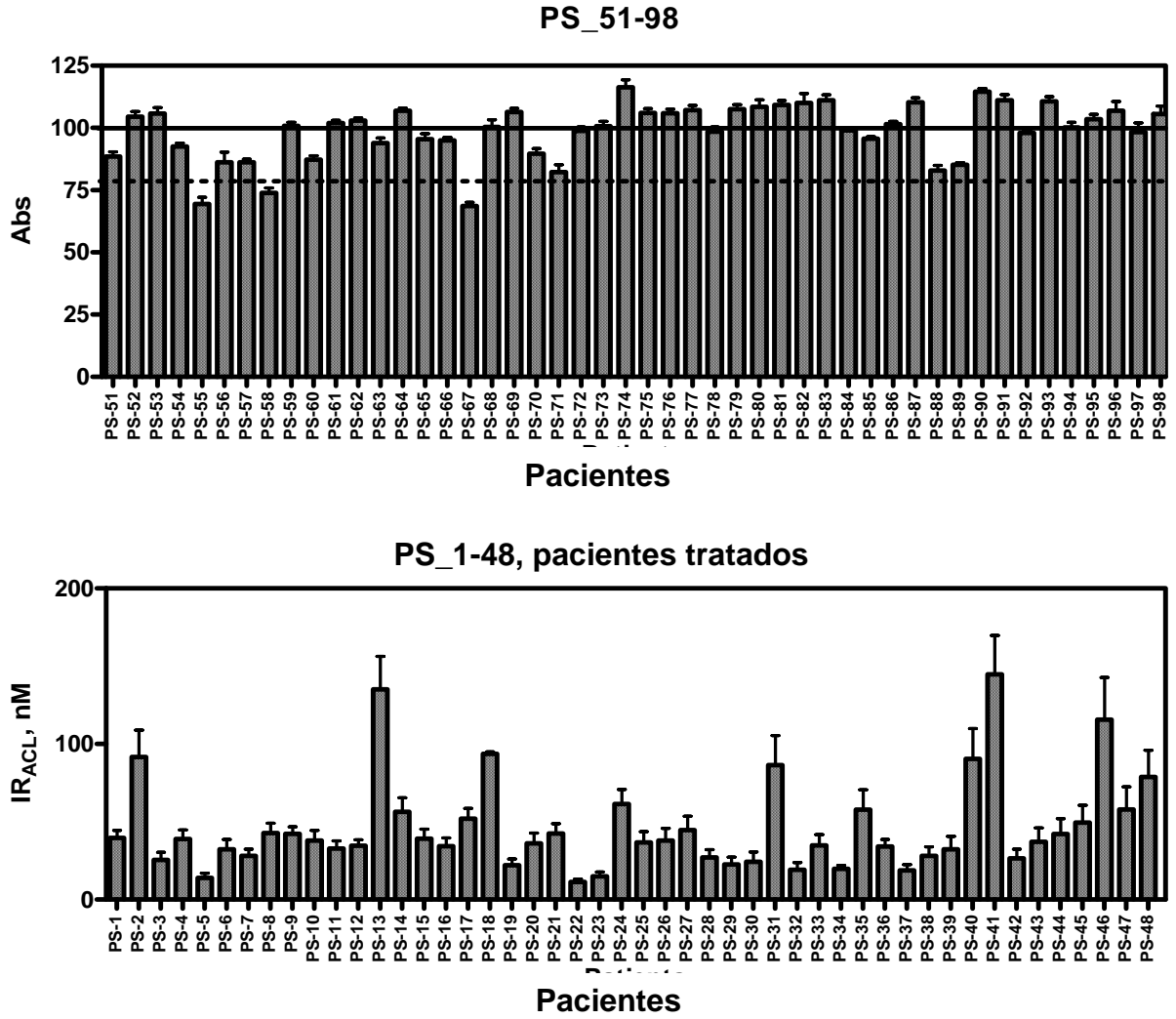


FIG. 5