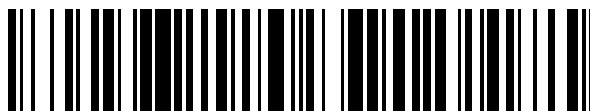


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 691**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2006 E 10075620 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2280281**

54 Título: **Inmunoanálisis de 5-fluoro-uracilo**

30 Prioridad:

08.02.2005 US 53480

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

14.08.2014

73 Titular/es:

**SALADAX BIOMEDICAL INC. (100.0%)
115 Research Drive, Jordan Hall
Bethlehem, PA 18015, US**

72 Inventor/es:

**SALAMONE, SALVATORE;
COURTNEY, JODI BLAKE y
STOCKER, DENNIS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 485 691 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoanálisis de 5-fluoro-uracilo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los análisis inmunológicos para determinar la presencia y/o cuantificar la cantidad de 5-fluoro-uracilo [5-FU] en muestras biológicas humanas con el fin de determinar de manera rápida las concentraciones farmacológicas óptimas durante una quimioterapia.

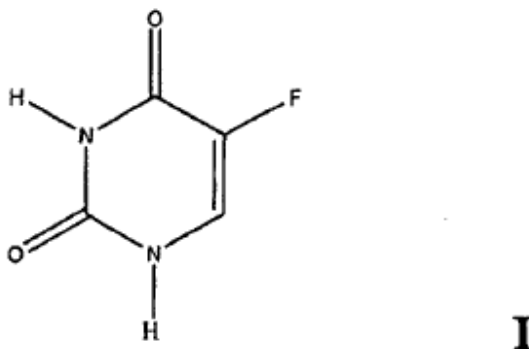
10

Antecedentes de la invención

“Cáncer” es un término usado para describir un grupo de tumores malignos que comparten el rasgo común de desarrollarse cuando las células de una parte del cuerpo comienzan a crecer sin control. La mayoría de los cánceres se forman como tumores, pero también se pueden manifestar en la sangre y circular a través de otros tejidos en los que crecen. La forma más común de tratar los tumores malignos cancerosos consiste en una combinación de cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. El tipo de tratamiento usado para tratar un determinado cáncer depende de varios factores entre los que se incluyen el tipo de tumor maligno canceroso y el estadio en el que fue diagnosticado.

15

20 El 5-FU es uno de los agentes citotóxicos más comúnmente usado para el tratamiento del cáncer de mama y colorrectal. Este agente quimioterapéutico tiene la fórmula:



25

Este compuesto se ha asociado con efectos secundarios debilitantes tales como la pérdida de densidad de la médula ósea, reacción mucositas, náuseas y vómitos. Mediante el control de los niveles de 5-FU en el cuerpo y el ajuste de la dosis, es posible controlar y limitar mejor estos efectos secundarios en los pacientes.

30

Al mismo tiempo, a menudo, existe una relación muy variable entre la dosis del 5-FU y la concentración de fármaco en suero resultante que afecta al efecto terapéutico. El grado de variabilidad farmacocinética intra- e interindividual del 5-FU puede ser tan elevado como de diez veces (Diasio *et. al. J. Clin. Invest.* 81: pág. 47-51, 1988, Wei *et. al. J. Clin. Invest.* 98: pág. 610-615, 1996) y se ve afectado por muchos factores que incluyen:

35

- la función orgánica,
- la regulación genética,
- el estado patológico,
- la edad,
- la interacción entre fármacos,
- el momento de la ingestión del fármaco,
- el modo de administración del fármaco y
- la administración en relación con la técnica.

40

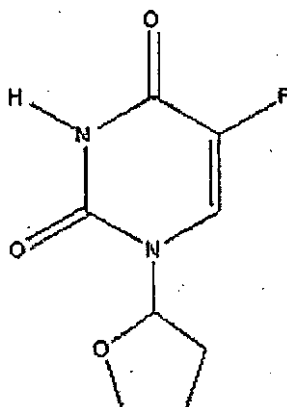
Como resultado de esta variabilidad, las dosis iguales de un mismo fármaco en individuos diferentes pueden producir resultados clínicos espectacularmente diferentes (Hon *et. al. Clinical Chemistry* 44, pág. 388-400, 1988). La eficacia de la misma dosis de 5-FU varía significativamente basándose en cada aclaramiento del fármaco y a la concentración de fármaco en suero final del paciente. La administración terapéutica del fármaco proporcionaría al profesional clínico la oportunidad de comprender la variación en el paciente en la administración tanto oral como intravenosa del fármaco. Con la administración terapéutica del fármaco, se podrían individualizar las dosis de fármaco para el paciente, y las posibilidades de tratar el cáncer de una manera eficaz, sin los no deseados efectos secundarios, podrían ser mucho mayores (Nieto, *Current Drug Metabolism* 2: pág. 53-66, 2001).

45

50 Además, la administración terapéutica del fármaco 5-FU serviría como una excelente herramienta para garantizar el cumplimiento de la administración de la quimioterapia con las dosis reales prescritas y el logro de niveles de

concentración en suero eficaces. Se ha descubierto que la variabilidad de la concentración en suero no sólo se debe a factores fisiológicos, sino que también puede ser el resultado de la variación en la técnica de la administración y la capacidad del cuerpo para absorber el 5-FU.

- 5 Como agente quimioterapéutico, el 5-FU se puede administrar en su forma de profármaco como tegafur, que tiene la estructura:



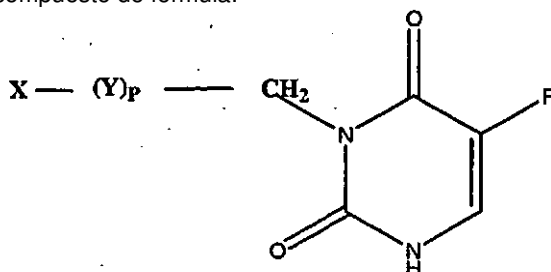
10 El tegafur, cuando se administra a un paciente, generalmente es absorbido y metabolizado por el paciente en 5-FU a distintas velocidades. Por lo tanto, en el control del nivel de 5-FU en pacientes por medio de un inmunoanálisis, es importante que el inmunoanálisis permita distinguir entre el tegafur, la sustancia inactiva y el 5-FU, la sustancia activa, en la que se metaboliza el tegafur. El problema con los anticuerpos contra el 5-FU es que podrían reaccionar de forma cruzada con el tegafur, inutilizando estos inmunoanálisis.

15 La administración terapéutica rutinaria del fármaco 5-FU requeriría la disponibilidad de sencillos análisis automáticos adaptables al equipo de laboratorio general. Los análisis que mejor cumplen estos criterios son los inmunoanálisis. Actualmente, no hay inmunoanálisis disponibles para el 5-FU y el control de los niveles de este fármaco se lleva a cabo mediante procedimientos físicos como la cromatografía líquida de alta presión (CLAP) (Escoriaza *et. al.*, *J. of Chromatography B: Biomedical Sciences and applications*, 736 (1+2): pág. 97-102, 1999). Con el fin de ser más eficaz en el control de los niveles de fármaco, el anticuerpo debería ser más específico del 5-FU y mostrar de muy
20 baja a ninguna reactividad cruzada hacia las bases de pirimidina relacionadas, particularmente, hacia el tegafur.

Sumario de la invención

25 De acuerdo con la presente invención, se ha producido una nueva clase de anticuerpos que reaccionan de manera sustancialmente selectiva con el 5-FU para unirse al 5-FU sin una reactividad cruzada sustancial hacia el tegafur, ni hacia otras bases de pirimidina interferentes, el uracilo y la citosina. Por selectivamente reactivo se entiende que este anticuerpo reacciona con la molécula de 5-FU y no reacciona sustancialmente con las otras bases de pirimidina interferentes tales como los análogos de 5-FU, siendo la base de pirimidina bloqueadora más importante el tegafur. Al proporcionar un anticuerpo que no reacciona sustancialmente de forma cruzada con el tegafur, se permite
30 proporcionar un inmunoanálisis para el 5-FU que puede controlar con precisión los niveles de 5-FU para el tratamiento terapéutico de pacientes que se están tratando con el 5-FU.

Se ha descubierto que mediante el uso de inmunógenos que son conjugados de un polímero de poliamina inmunogénico con un compuesto de fórmula:



II-A

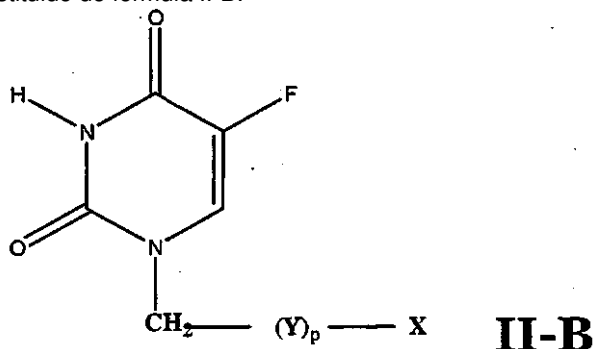
35 en la que Y es un grupo espaciador orgánico; X es un grupo funcional terminal capaz de unirse a un polímero de poliamina; y p es un número entero de 0 a 1; se producen anticuerpos que son específicos del 5-FU y no reaccionan sustancialmente con ni se unen al tegafur, ni a otras bases de pirimidina tales como el uracilo y la citosina. El suministro de estos anticuerpos que reaccionan de manera sustancialmente selectiva con el 5-FU y no reaccionan de manera cruzada con el tegafur permite producir un inmunoanálisis que puede detectar y controlar específicamente el 5-FU en muestras de fluidos de pacientes que
40 estén siendo tratados con 5-FU. También se desvelan reactivos y kits para dicho inmunoanálisis. La presencia del

tegafur es la causa principal de lecturas de falsos positivos que han hecho que los inmunoanálisis para el 5-FU no sean adecuados.

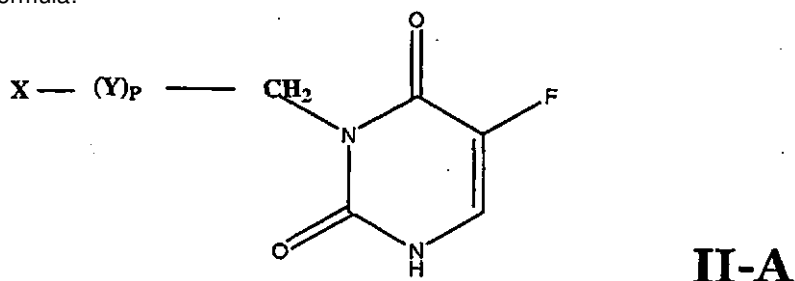
Descripción detallada

5 Se desvela una nueva clase de anticuerpos que reaccionan de manera sustancialmente selectiva con el 5-FU y no reaccionan sustancialmente ni reaccionan de manera cruzada con el tegafur ni con otras bases de pirimidina interferentes tales como uracilo y citosina. Se ha descubierto que con el uso del derivado de 5-FU 3-sustituido de fórmula II-A como inmunógeno, se proporciona esta nueva clase de anticuerpos de la presente invención. Es
10 mediante el uso de estos anticuerpos que se ha desarrollado un inmunoanálisis, incluyendo reactivos y kits para dicho inmunoanálisis, para detectar y/o cuantificar el 5-FU en muestras de sangre, plasma u otros fluidos corporales. Mediante el uso de este inmunoanálisis, se puede detectar y/o cuantificar la presencia y la cantidad de 5-FU en muestras de fluidos corporales, preferentemente, en una muestra de sangre o de plasma. De esta manera, se puede hacer un seguimiento de un paciente que esté siendo tratado con 5-FU durante una terapia y ajustar su tratamiento según dicho seguimiento. Por medio de la presente invención, se consigue la administración terapéutica del fármaco de 5-FU en pacientes con cáncer que estén siendo tratados con 5-FU como agente quimioterapéutico.

Los reactivos utilizados en el inmunoanálisis desvelado en el presente documento son conjugados de un vehículo con el compuesto de 5-FU 1-sustituido de fórmula II-B:



20 en la que p, Y y X son como se definen anteriormente;
o un compuesto de fórmula:



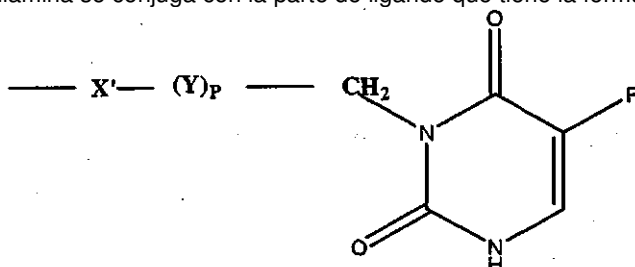
25 en la que Y es un grupo espaciador orgánico;
X es un grupo funcional terminal capaz de unirse a un polímero de poliamina;
p es un número entero de 0 a 1;
o mezclas de los mismos.

30 En los reactivos de fórmula II-A y II-B, el vehículo puede ser cualquiera de los vehículos reactivos convencionales utilizados en la realización de inmunoanálisis, preferentemente, estos vehículos están marcados para su detección. En el compuesto de fórmula II-A, que se utiliza en la formación de los reactivos usados en el análisis, X puede ser cualquier grupo funcional capaz de unirse al vehículo. Los vehículos preferidos contienen un polímero de poliamina polimérica con un grupo amino reactivo y X es un grupo funcional terminal capaz de unirse a un polímero de poliamina.

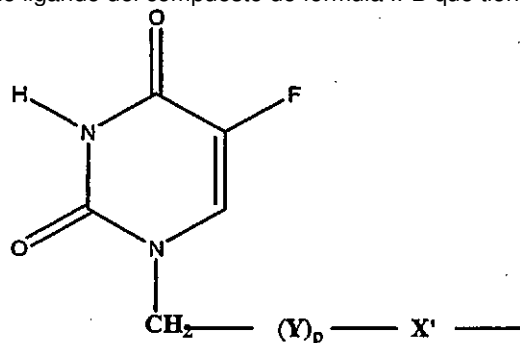
35 En el inmunoanálisis desvelado en el presente documento, estos conjugados son parejas de unión competitiva con el 5-FU presente en la muestra por la unión con los anticuerpos de la presente invención. Por lo tanto, la cantidad de reactivo del conjugado que se une con el anticuerpo será inversamente proporcional a la cantidad de 5-FU de la muestra. El análisis utiliza cualquier procedimiento de medición convencional para detectar y medir la cantidad de dicho conjugado que está unido o no está unido con el anticuerpo. Mediante el uso de dicho procedimiento, se puede determinar la cantidad de conjugado unido o no unido. Generalmente, la cantidad de 5-FU de una muestra se determina correlacionando la cantidad medida del conjugado unido o no unido producido por el 5-FU en la muestra con valores del conjugado unido o no unido determinados a partir de muestras patrón o de curvas de calibración que contienen cantidades conocidas de 5-FU, cuyas cantidades conocidas están en el intervalo esperado para la muestra que se vaya a analizar. Estos estudios para producir curvas de calibración se determinan usando el mismo

procedimiento de inmunoanálisis usado para la muestra.

Los conjugados se preparan a partir de compuestos de fórmulas II-A y II-B, mientras que los inmunógenos se preparan a partir de compuestos de fórmula II-A. Para realizar el inmunoanálisis desvelado en el presente documento, es importante que el conjugado se forme a partir del compuesto de fórmulas II-A o II-B, y que el inmunógeno se forme a partir del compuesto de fórmula II-A. En los conjugados que incluyen los inmunógenos, el polímero de poliamina se conjuga con la parte de ligando que tiene la fórmula:



en la que Y y p son como se definen anteriormente; y
 x' es -CH₂- o un grupo ligador funcional;
 o con la parte de ligando del compuesto de fórmula II-B que tiene la fórmula:



en la que x', Y y p son como se definen anteriormente.

Estas partes de ligando pueden estar en uno o más sitios activos del vehículo del conjugado.

Definiciones

A lo largo de la presente descripción, se han de entender las siguientes definiciones:

Los términos "inmunógeno" e "inmunogénico" se refieren a sustancias capaces de provocar, producir o generar una respuesta inmune en un organismo.

El término "conjugado" se refiere a cualquier sustancia formada a partir de la unión de dos partes. Los conjugados representativos de acuerdo con la presente invención incluyen los formados mediante la unión de una molécula pequeña, tal como el compuesto de fórmula II-B, y una molécula grande, tal como un vehículo o un polímero de poliamina, particularmente, una proteína. En el conjugado, la molécula pequeña puede estar unida a uno o más sitios activos de la molécula grande.

"Haptenos" son antígenos parciales o incompletos. Son sustancias libres de proteínas, en su mayor parte, sustancias de bajo peso molecular, que no son capaces de estimular la formación de anticuerpos, pero que reaccionan con los anticuerpos. Éstos se forman mediante el acoplamiento de un hapteno con un vehículo inmunogénico de alto peso molecular y luego la inyección de este producto acoplado, es decir, el inmunógeno, en un sujeto humano o animal. El hapteno de la presente invención es 5-FU.

Como se usa en el presente documento, un "grupo espaciador" o "espaciador" se refiere a una parte de una estructura química que conecta dos o más subestructuras, tales como haptenos, vehículos, inmunógenos, marcadores o trazadores, a través de un grupo CH₂ o un grupo de unión funcional. Estos grupos espaciadores se enumerarán de aquí en adelante en la presente solicitud. Los átomos de un grupo espaciador y los átomos de una cadena del grupo espaciador se conectan entre sí mediante enlaces químicos. Entre los espaciadores preferidos están las cadenas de carbonos, saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas. Estas cadenas de carbonos también pueden incluir uno o más heteroátomos en la cadena o en los terminales de las cadenas. "Heteroátomos" pretende significar átomos distintos del carbono que se seleccionan del grupo constituido por oxígeno, nitrógeno o azufre. Los grupos espaciadores también pueden incluir grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos de la cadena.

El número de átomos del grupo espaciador se determina contando los átomos distintos del hidrógeno. El número de átomos de una cadena de un grupo espaciador se determina contando el número de átomos distintos del hidrógeno a lo largo de la ruta más corta entre las subestructuras que se están conectando. Se puede usar un grupo ligador funcional para activar, por ejemplo, para proporcionar un sitio funcional disponible en un hapteno o grupo espaciador para sintetizar un conjugado de un hapteno con un marcador o un vehículo o un polímero de poliamina.

Un "vehículo inmunogénico", como se usa la expresión en el presente documento, es una sustancia inmunogénica, comúnmente, una proteína, que se puede unir con un hapteno, en este caso, 5-FU o los derivados de 5-FU de fórmula II-A descritos, permitiendo así que estos derivados de hapteno induzcan una respuesta inmune y generen la producción de anticuerpos que puedan unirse específicamente con estos haptenos. En lo sucesivo, en la presente solicitud, se enumerarán los vehículos inmunogénicos y los grupos de unión. Entre las sustancias vehículo inmunogénicas se incluyen proteínas, glucoproteínas, poliamino-polisacáridos complejos, partículas y ácidos nucleicos que son reconocidos como foráneos y provocan, por tanto, una respuesta inmunológica en el huésped. Los poliamino-polisacáridos se pueden preparar a partir de polisacáridos usando cualquier procedimiento convencional conocido para esta preparación.

También se pueden emplear diversos tipos de proteínas como vehículo inmunogénico de poli(aminoácido). Estos tipos incluyen albúminas, proteínas séricas, lipoproteínas, etc. Las proteínas ilustrativas incluyen la albúmina de suero bovino (ASB), la hemocianina de lapa californiana (KLH), la ovoalbúmina, la tiroglobulina bovina (TGB), etc. Alternativamente, se pueden utilizar poli(aminoácidos) sintéticos.

Los vehículos inmunogénicos también pueden incluir poliamino-polisacáridos, que son un polímero de alto peso molecular formado mediante condensaciones repetidas de monosacáridos. Los ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa, gomas de hidratos de carbono tales como goma arábica, agar, etcétera. Los polisacáridos también contienen residuos de poliaminoácido y/o residuos lipídicos.

El vehículo inmunogénico también puede ser un poli(ácido nucleico) bien solo o conjugado con uno de los poli(aminoácidos) o polisacáridos anteriormente mencionados.

El vehículo inmunogénico también puede incluir partículas sólidas. Las partículas son generalmente de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros (μm) o de no más de aproximadamente 100 μm , y habitualmente, de un diámetro de aproximadamente 0,05 μm a 10 μm . La partícula puede ser orgánica o inorgánica, expandible o no expandible, porosa o no porosa, óptimamente, de una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente de aproximadamente 0,7 a 1,5 g/ml, y estar compuesta de un material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos, tales como células y microorganismos, incluyendo ejemplos no restrictivos tales como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y virus. Las partículas también pueden estar compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, látex, vesículas posfolipídicas o lipoproteínas.

"Poli(aminoácido)" o "polipéptido" es una poliamida formada por aminoácidos. Los poli(aminoácidos) variarán generalmente de un peso molecular de aproximadamente 2.000, sin límite superior de peso molecular, siendo normalmente de menos de 10.000.000 y, habitualmente, de no más de aproximadamente 600.000 daltons. Habitualmente, habrá diferentes intervalos en función de si hay implicado o no un vehículo inmunogénico o una enzima.

Un "péptido" es cualquier compuesto formado por el enlace de dos o más aminoácidos mediante enlaces de tipo amida (peptídicos), habitualmente, un polímero de α -aminoácidos en el que el grupo α -amino de cada residuo de aminoácido (a excepción del terminal NH_2) está unido al grupo α -carboxilo del siguiente residuo de la cadena lineal. Los términos péptido, polipéptido y poli(aminoácido) se usan como sinónimos en el presente documento para referirse a esta clase de compuestos sin ninguna restricción en cuanto al tamaño. Los miembros más grandes de esta clase se denominan proteínas.

Un "marcador", una "molécula detectora" o un "trazador" es cualquier molécula que produce, o que puede ser inducida a producir, una señal detectable. El marcador puede estar conjugado a un analito, un inmunógeno, un anticuerpo u otra molécula, tal como un receptor o una molécula que se pueda unir con un receptor tal como un ligando, particularmente, un hapteno. Los ejemplos no restrictivos de marcadores incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fragmentos enzimáticos, sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, coenzimas, catalizadores, fluoróforos, colorantes, quimioluminiscentes, luminiscentes o sensibilizadores; una partícula no magnética o magnética, un soporte sólido, un liposoma, un ligando o un receptor.

El término "anticuerpo" se refiere a una pareja de unión proteica específica para un antígeno, y es cualquier sustancia o grupo de sustancias que tenga una afinidad de unión específica por un antígeno hasta la exclusión de otras sustancias. El término genérico "anticuerpo" subsume anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos.

El término "derivado" se refiere a un compuesto químico o una molécula formada a partir de un compuesto precursor mediante una o más reacciones químicas.

5 El término "vehículo" para formar el conjugado de fórmula II-B se refiere a partículas sólidas y/o polímeros poliméricos, tales como polímeros inmunogénicos, tales como aquéllos mencionados anteriormente. Cuando el vehículo es una partícula sólida, la partícula sólida puede estar unida, revestida con o unida de otro modo con un polímero de poliamina para proporcionar uno o más sitios reactivos para la unión con el grupo funcional terminal X de los compuestos de fórmula II-B.

10 La expresión "kit de reactivos" o "kit de análisis" se refiere a un conjunto de materiales que se usan en la realización de un análisis. Los reactivos se pueden proporcionar en una combinación empaquetada en el mismo envase o en envases separados en función de sus reactividades cruzadas y estabildades, y en forma líquida o liofilizada. Las cantidades y las proporciones de los reactivos proporcionados en el kit se pueden seleccionar para proporcionar resultados óptimos para una determinada aplicación. Un kit de reactivos que incorpora las características de la presente invención comprende anticuerpos específicos del 5-FU. El kit puede comprender además ligandos del analito, y materiales de calibración y de control. Los reactivos pueden permanecer en estado líquido o pueden estar liofilizados.

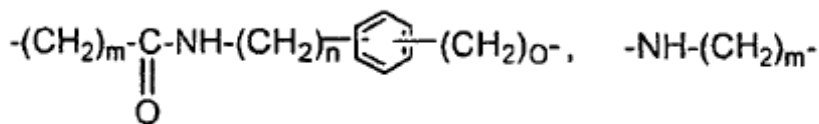
20 La expresión "materiales de calibración y de control" se refiere a cualquier patrón o material de referencia que contiene una cantidad conocida de un fármaco que se vaya a medir. La concentración del fármaco se calcula comparando los resultados obtenidos para la muestra desconocida con los resultados obtenidos para el patrón. Esto se hace comúnmente trazando una curva de calibración.

25 La expresión "muestra biológica" incluye, pero sin limitación, cualquier cantidad de una sustancia procedente de un ser vivo o un ser anteriormente vivo. Dichos seres vivos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos, caballos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, pero sin limitación, sangre, suero, plasma, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, linfa, nódulos linfáticos, tejido sinovial, condrocitos, macrófagos sinoviales, células endoteliales y piel.

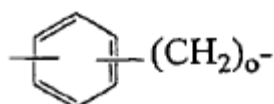
30 Reactivos e inmunógenos

En la preparación de un inmunoanálisis, se forma un conjugado de 5-FU para competir con el 5-FU de la muestra por los sitios de unión de los anticuerpos de la presente invención. En el presente inmunoanálisis, el inmunógeno para la producción de los anticuerpos de la presente invención es el derivado de 5-FU 3-sustituido de los compuestos de fórmula III-A y el reactivo es los derivados de 5-FU 1-sustituidos de fórmulas III-A o III-B. En los compuestos de fórmula III-A y III-B, el espaciador ligador constituye la parte $-\text{CH}_2-(\text{Y})_p-\text{X}'-$ de esta molécula. El ligador X' y el espaciador $-\text{CH}_2-(\text{Y})_p-$ son los convencionales en la preparación de conjugados e inmunógenos. Se puede utilizar cualquiera de los grupos que ligan espaciadores convencionales utilizados para preparar conjugados e inmunógenos para los inmunoanálisis en los compuestos de fórmula III-A y III-B. Dichos ligadores y espaciadores convencionales se divulgan en la patente estadounidense N° 5.501.987 y patente estadounidense N° 5.101.015.

Entre los grupos espaciadores preferidos se incluyen los grupos espaciadores mencionados anteriormente en el presente documento. Los grupos espaciadores particularmente preferidos son grupos tales como el alquileo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,



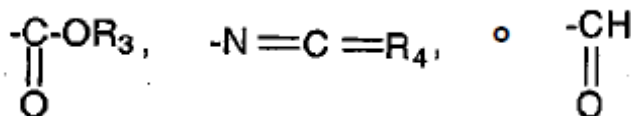
45 o



50 en la que n y o son números enteros de 0 a 6 y m es un número entero de 1 a 6, siendo el alquileo el grupo espaciador especialmente preferido. Con respecto a las estructuras anteriores representadas por Y, el grupo funcional terminal X está conectado a estos sustituyentes por su terminal y por el lado derecho de las estructuras, es decir, por el extremo designado por $(\text{CH}_2)_o$ o $(\text{CH}_2)_m$.

55 En los compuestos de fórmula III-A y III-B, X' es $-\text{CH}_2-$ o un grupo funcional que liga el espaciador, preferentemente, a un grupo amina del polímero o del vehículo. El grupo X' es el resultado del grupo funcional terminal X en los compuestos de fórmula II-A y II-B, que es capaz de unirse al grupo amino del polímero de poliamina usado bien

como vehículo o como inmunógeno. Se puede utilizar cualquier grupo funcional terminal capaz de reaccionar con una amina como el grupo funcional X en los compuestos de fórmula II-A y II-B. Estos grupos funcionales terminales incluidos preferentemente en X son:



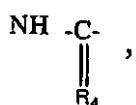
5 en la que R₃ es hidrógeno o tomado, junto con su átomo de oxígeno unido forma un éster reactivo, y R₄ es oxígeno o azufre. El radical -N=C=R₄ puede ser un isocianato o un isotiocianato. Los ésteres activos formados por OR₃ incluyen imidoéster tal como *N*-hidroxisuccinamida, 1-hidroxi-benzotriazol y *p*-nitrofeniléster. Sin embargo, se puede usar cualquier éster activo que pueda reaccionar con un grupo amina.

10 El grupo carboxílico y los ésteres activos son acoplados al vehículo o al polímero inmunogénico mediante procedimientos convencionales. El grupo amina del polímero de poliamina, tal como una proteína, produce un grupo amida que conecta el espaciador con el polímero, los inmunógenos o el vehículo y/o los conjugados de la presente invención.

15 En los inmunógenos y los conjugados de la presente invención, los enlaces químicos entre el haptenos de 5-FU que contiene grupos carboxilo y los grupos amino del polímero de poliamina del vehículo o del inmunógeno se pueden establecer usando una variedad de procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Frecuentemente, es preferible formar enlaces de tipo amida. Los enlaces de tipo amida se forman activando primero el resto de ácido carboxílico del hapteno de 5-FU de los compuestos de fórmula II-A y II-B haciendo reaccionar el grupo carboxilo con un reactivo de grupo saliente (por ejemplo, *N*-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol, *p*-nitrofenol y similares). Se puede usar un reactivo activador tal como diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida y similares. Luego se hace reaccionar la forma activada del grupo carboxilo del hapteno de 5-FU de fórmula II-A o II-B con una solución tamponada que contiene el vehículo proteico.

25 En los casos en los que el derivado de 5-FU de fórmula II-A o II-B contiene un grupo amino primario o secundario, así como el grupo carboxilo, es necesario usar un grupo protector de aminas durante las reacciones de activación y acoplamiento para evitar que los conjugados reaccionen entre sí. Normalmente, las aminas del conjugado se protegen formando la correspondiente *N*-trifluoroacetamida, *N*-*tert*-butiloxicarbonil-uretano (*N*-*t*-BOC-uretano), *N*-carbobenciloxi-uretano o una estructura similar. Una vez realizada la reacción de acoplamiento con el polímero o vehículo inmunogénico, según lo descrito anteriormente, se puede retirar el grupo protector de aminas usando reactivos que no alteren de otro modo la estructura del inmunógeno o del conjugado. Dichos reactivos y procedimientos son conocidos por el experto en la técnica e incluyen ácidos anhídros o acuosos débiles o fuertes, bases anhídros o acuosas débiles o fuertes, reactivos que contienen hidruro, tales como borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio y la hidrogenación catalítica. En la patente estadounidense N° 3.996.344 y la patente estadounidense N° 4.016.146, se revelan diversos procedimientos de conjugación de haptenos y vehículos.

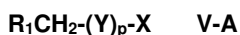
Por otro lado, cuando X es un radical de isocianato o de tioisocianato terminal del compuesto de fórmula II-A o II-B, estos radicales, cuando han reaccionado con la amina libre de un polímero de poliamina, producen el conjugado de fórmula III-B o el inmunógeno, en el que X' es



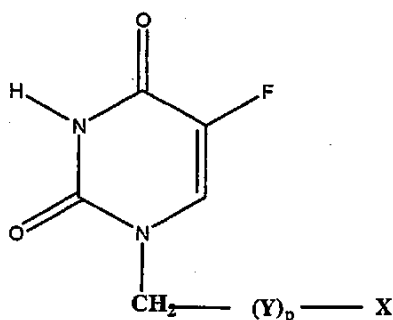
40 en la que R₄ es como se define anteriormente, que se conecta funcionalmente con el vehículo o el polipéptido inmunogénico.

45 Cuando X, en los compuestos de fórmula II-A y II-B, es un grupo aldehído, estos compuestos pueden estar conectados al grupo amina del polipéptido de poliamina o del vehículo a través de un enlace de tipo amina mediante aminación reductora. Se puede usar cualquier procedimiento convencional de condensación de un aldehído con una amina, tal como a través de una aminación reductora para formar este enlace. En este caso, X' de las partes ligandos de fórmula III-A y III-B es -CH₂-.

50 Los átomos de 1-nitrógeno del compuesto de fórmula I se pueden conectar para formar el compuesto de fórmula II-B haciendo reaccionar el 5-FU con un haluro de fórmula:



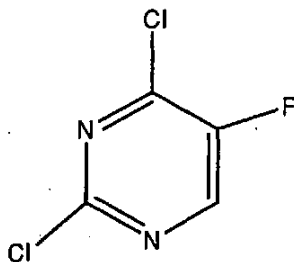
55 en la que R₁ es cloro o bromo e Y, p y X son como se especifican anteriormente, para producir el compuesto de fórmula:



II-B

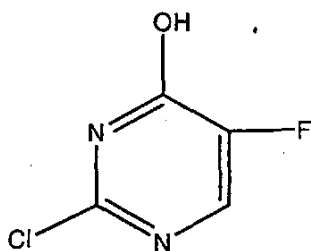
5 El compuesto de fórmula I se hace reaccionar en su átomo de nitrógeno de anillo 1 con el haluro de fórmula V-A para formar los compuestos de fórmula II-B mediante cualquier procedimiento convencional de condensación de un haluro con un grupo amina. Esta reacción de condensación se lleva a cabo en presencia de una base. En esta reacción, el átomo de nitrógeno del anillo de la posición 1 del compuesto de fórmula I es más reactivo que el átomo de nitrógeno del anillo de la posición 3. Por lo tanto, el átomo de nitrógeno del anillo de la posición 1, preferentemente, se condensará con el haluro. Si el compuesto de fórmula V-A contiene cualquier amino reactivo u otro sustituyente funcional, se pueden hacer reaccionar estos sustituyentes con grupos protectores convencionales antes de la reacción del 5-FU con un compuesto de V-A. Una vez producido el compuesto de fórmula VI-A, estos grupos protectores se pueden eliminar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica para la eliminación de dichos grupos protectores, manteniendo la amina en el compuesto de fórmula II-B.

15 El 5-FU 3-sustituido de fórmula II-A se puede preparar a partir de 5-FU, convirtiendo primero el 5-FU en el compuesto de dicloro de fórmula:



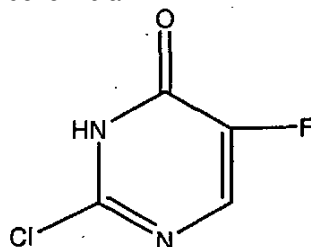
VII

20 Esto se logra mediante el tratamiento del compuesto de fórmula I con un agente de cloración tal como oxiclورو de fósforo. Se puede usar cualquiera de las condiciones convencionales en la utilización de estos agentes de cloración para llevar a cabo esta reacción. En la siguiente etapa, el compuesto de fórmula VII se convierte en el compuesto de fórmula:



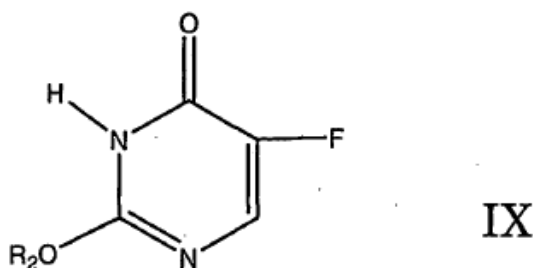
VIII-A

que se enoliza en el compuesto de fórmula:



VIII-B

25 Esta conversión se lleva a cabo tratando el compuesto de fórmula VII con hidróxido de sodio en un medio acuoso a una temperatura de 35 °C a 50 °C. El compuesto de fórmula VIII-B se puede convertir en el compuesto de la fórmula:



en la que R_2 es bencilo.

5 En la formación del compuesto de fórmula IX, se hace reaccionar el compuesto de fórmula VIII-B con alcohol bencilico en un disolvente orgánico en presencia de hidróxido de sodio sólido. En la siguiente etapa, el compuesto de fórmula IX se convierte en el compuesto de fórmula II-A mediante la reacción del compuesto de fórmula IX con el haluro de fórmula V-A, de la manera descrita anteriormente en relación con la condensación del compuesto de fórmula I con el haluro de fórmula V-A.

10 El compuesto de fórmulas II-A o II-B se puede convertir en el vehículo reactivo del conjugado de la presente invención haciendo reaccionar estos compuestos con una poliamina, un polipéptido o un vehículo. Se puede utilizar el mismo polipéptido como vehículo en el compuesto de fórmula II-B y como polímero inmunogénico en el inmunógeno de fórmula II-A de la presente invención con la condición de que la poliamina o el polipéptido sean inmunológicamente activos. Sin embargo, para formar los conjugados, es necesario que estos polímeros no produzcan una respuesta inmunológica como la necesaria para los inmunógenos. De acuerdo con la presente invención, se pueden conjugar los diversos grupos funcionales representados por X en los compuestos de fórmula II-A y II-B con el material polimérico mediante procedimientos convencionales de unión de un grupo funcional con un grupo amina contenido en el polímero. Según una realización preferida, en el compuesto de fórmula II-A y II-B, X es un grupo de ácido carboxílico o sus ésteres activos.

20 Anticuerpos

En el presente documento, también se desvelan nuevos anticuerpos incluyendo anticuerpos monoclonales contra el 5-FU producidos utilizando los inmunógenos anteriormente mencionados. Se ha encontrado que estos anticuerpos producidos de acuerdo con la presente invención son selectivamente reactivos con el 5-FU, y no reaccionan con el tegafur ni con otros compuestos que contienen pirimidina que interferirían con los inmunoanálisis del 5-FU.

30 Los antisueros se pueden producir convenientemente inmunizando animales huésped con los inmunógenos de la presente invención. Los animales huésped adecuados incluyen roedores tales como, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cobayas y similares, o mamíferos superiores, tales como cabras, ovejas, caballos y similares. Las dosis iniciales, las sangrías y las inyecciones de refuerzo se pueden ofrecer según protocolos aceptados para generar respuestas inmunes en animales. Por ejemplo, en una realización preferida, los ratones recibieron una dosis inicial de 100 ug de inmunógeno/ratón, i.p., y dos o más inyecciones de refuerzo posteriores de 100 ug inmunógeno/ratón en un período de seis meses. Mediante una sangría periódica, se observaron las muestras de sangre de los ratones inmunizados en cuanto al desarrollo de una respuesta inmune frente a la unión al 5-FU utilizando inmunoanálisis convencionales. Estos procedimientos proporcionan un modo conveniente de rastrear los huéspedes que estén produciendo antisueros que tengan la actividad deseada.

40 Los anticuerpos monoclonales se producen convenientemente inmunizando ratones Balb/c según el plan anterior e inyectando después 100 ug de inmunógeno i.p. o i.v. en los ratones en tres días sucesivos comenzando tres días antes de la fusión celular. Por supuesto, también se pueden utilizar otros protocolos ampliamente conocidos en la técnica de los anticuerpos. El protocolo de inmunización completo detallado en el presente documento proporcionó un protocolo óptimo para la respuesta de los anticuerpos en suero contra el 5-FU.

45 Se pueden usar linfocitos B obtenidos de bazo, sangre periférica, nódulos linfáticos u otro tejido del huésped como la célula productora de anticuerpos monoclonales. Los más preferidos son los linfocitos B obtenidos del bazo. Los hibridomas capaces de generar los anticuerpos monoclonales deseados de la invención se obtienen fusionando dichos linfocitos B con una línea celular inmortal, que es una línea celular que confiere una estabilidad al cultivo tisular a largo plazo en la célula híbrida. En la realización preferida de la invención, la célula inmortal puede ser una célula linfoblastoide o una célula de plasmacitoma, tal como una célula de mieloma, una célula productora de anticuerpos, pero también una célula maligna. Los hibridomas murinos que producen anticuerpos monoclonales contra el 5-FU se forman mediante la fusión de células de mieloma y células de bazo murinas procedentes de ratones inmunizados contra conjugados de 5-FU-proteína. Es posible producir anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados mediante la clonación de genes que expresan los anticuerpos de las células de hibridoma y el empleo de procedimientos de ADN recombinante que en la actualidad se conocen ampliamente en la técnica, bien para unir la subsecuencia de la región variable murina con las regiones constantes humanas o para combinar las

regiones marco humanas con regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina de ratón o de rata donante. En la solicitud de patente internacional WO 92/11018, se expone un procedimiento mejorado para llevar a cabo la humanización de anticuerpos monoclonales murinos que proporciona anticuerpos de mayores afinidades.

5 Se pueden producir fragmentos polipeptídicos que sólo comprendan una parte de la estructura primaria del anticuerpo, fragmentos que poseen una o más actividades de la inmunoglobulina. Estos fragmentos polipeptídicos se pueden producir mediante la escisión proteolítica de anticuerpos intactos mediante procedimientos ampliamente conocidos en la técnica, o insertando codones de terminación en las ubicaciones deseadas de los vectores de expresión que contienen los genes frente a los anticuerpos usando una mutagénesis de sitio dirigida para producir fragmentos Fab o fragmentos (Fab')₂. Se pueden producir anticuerpos monocatenarios uniendo las regiones VL y VH con un ligador de ADN (véase Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85:5879-5883 (1988) y Bird *et al.*, *Science*, 242:423-426 (1988)).

15 Los anticuerpos desvelados son selectivos del 5-FU, y no tienen ninguna reactividad cruzada sustancial con bases de pirimidina tales como el uracilo, la citosina, el tegafur etc. No tener ninguna reactividad cruzada sustancial pretende significar que los anticuerpos de la presente invención tienen una reactividad cruzada relativa al 5-FU con estos metabolitos de no más del 12 %, preferentemente, de menos del 5 %.

20 Inmunoanálisis

De acuerdo con la presente invención, los conjugados y los anticuerpos anteriormente mencionados generados a partir de los inmunógenos de estos compuestos de fórmula II-A se pueden utilizar como reactivos para la determinación del 5-FU en muestras de pacientes. Esta determinación se realiza por medio de un inmunoanálisis. Para determinar la presencia del 5-FU en una muestra de paciente, se puede utilizar cualquier inmunoanálisis en el que los conjugados de reactivos formados a partir de los compuestos de fórmula II-B compiten con el 5-FU en la muestra por los sitios de unión de los anticuerpos generados de acuerdo con la presente invención. La manera de llevar a cabo dicho análisis para el 5-FU en una muestra sospechosa de contener 5-FU comprende combinar (a) una muestra en medio acuoso, (b) un anticuerpo contra el 5-FU generado de acuerdo con la presente invención y (c) los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmulas II-A y II-B. La cantidad de 5-FU de la muestra se puede determinar midiendo la inhibición de la unión con el anticuerpo específico de una cantidad conocida del conjugado añadida a la mezcla de la muestra y el anticuerpo. El resultado de la inhibición de dicha unión de la cantidad conocida de conjugados mediante la muestra desconocida se compara con los resultados obtenidos en el mismo análisis utilizando soluciones patrón conocidas del 5-FU. En la determinación de la cantidad de 5-FU en una muestra desconocida, la muestra, los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmula II-B y el anticuerpo se pueden añadir en cualquier orden.

Se pueden utilizar diversos procedimientos para medir la cantidad de conjugado formado a partir de los compuestos de fórmulas II-A y II-B unidos al anticuerpo. Un procedimiento es aquél en el que la unión de los conjugados con el anticuerpo provoca una disminución en la velocidad de rotación de un conjugado de fluoróforo. La cantidad de disminución en la velocidad de rotación de un conjugado de fluoróforo en la mezcla líquida se puede detectar mediante la técnica de polarización fluorescente, tal como se revela en la patente estadounidense N° 4.269.511 y la patente estadounidense N° 4.420.568.

Por otro lado, se puede utilizar el anticuerpo para revestir o ser absorbido en nanopartículas de modo que cuando estas partículas reaccionan con los conjugados del 5-FU formados a partir de los compuestos de fórmulas II-A y II-B, estas nanopartículas formen un agregado. Sin embargo, cuando las nanopartículas que han absorbido o han sido revestidas con el anticuerpo reaccionan con el 5-FU de la muestra, el 5-FU de la muestra unido a estas nanopartículas no produce la agregación de las nanopartículas con anticuerpo. La cantidad de agregación o aglutinamiento se puede medir en la mezcla de análisis mediante absorbancia.

Por otro lado, estos análisis se pueden llevar a cabo teniendo bien el anticuerpo o los conjugados de 5-FU unidos a un soporte sólido, tal como una placa de microtitulación o cualquier otro soporte sólido convencional, incluyendo partículas sólidas. La unión de anticuerpos y proteínas a tales partículas sólidas es ampliamente conocida en la técnica. Se puede utilizar cualquier procedimiento convencional para llevar a cabo dichas uniones. En muchos casos, para ayudar en la medición, se pueden colocar marcadores sobre los anticuerpos, los conjugados o las partículas sólidas, tales como marcadores radiactivos o marcadores enzimáticos, para que ayuden en la detección de la cantidad de los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmula II-B que esté unida o no unida con el anticuerpo. Otros marcadores adecuados incluyen cromóforos, fluoróforos, etc.

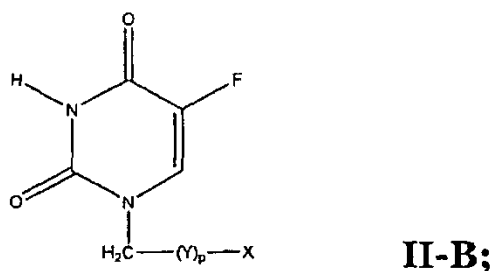
Por comodidad, los componentes del análisis desvelado en el presente documento se pueden proporcionar en un kit, una combinación envasada con cantidades predeterminadas de nuevos reactivos empleados en el análisis del 5-FU. Estos reactivos incluyen el anticuerpo de la presente invención, así como los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmulas II-A y II-B.

65

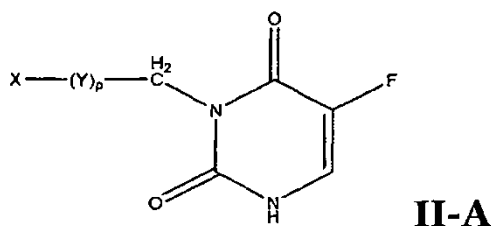
Además de estos reactivos necesarios, se pueden incluir aditivos tales como reactivos auxiliares, por ejemplo, estabilizadores, tampones y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del análisis. Se pueden proporcionar los reactivos en disolución o en forma de un polvo seco, habitualmente, liofilizado, incluyendo excipientes que, en disolución, proporcionarán una solución de reactivos que tendrá las concentraciones apropiadas para realizar el análisis.

También se desvelan:

- 10 1. Un inmunoanálisis para la detección de 5-fluoro-uracilo en una muestra que comprende proporcionar una mezcla de a) una muestra; b) un anticuerpo reactivo selectivamente con 5-fluoro-uracilo, anticuerpo que no reacciona sustancialmente de forma cruzada con el tegafur; y c) un conjugado de un vehículo con un compuesto de fórmula:



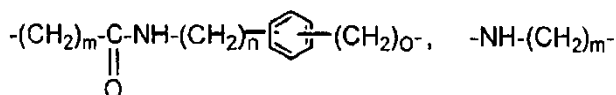
- 15 en la que Y es un grupo espaciador orgánico; X es un grupo funcional terminal capaz de unirse al vehículo; y p es un número entero de 0 a 1; o un compuesto de fórmula:



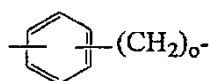
- 20 en la que X, Y y p son como se han definido anteriormente; o una mezcla de los mismos; hacer que el 5-fluoro-uracilo de la muestra y dicho conjugado se unan con dicho anticuerpo y, tras ello, medir la cantidad de dicho conjugado de dicha mezcla que se está unido o no está unido a dicho anticuerpo, mediante lo que se puede determinar la presencia de 5-fluoro-uracilo en la muestra.

- 25 2. Un inmunoanálisis de acuerdo con el aspecto 1, en el que p es 0 en el compuesto de fórmula II-A y/o el compuesto de fórmula II-B.
30 3. Un inmunoanálisis de acuerdo con el aspecto 1, en el que p es 1 en el compuesto de fórmula II-A y/o el compuesto de fórmula II-B.

4. Un inmunoanálisis de acuerdo con el aspecto 3, en el que Y es alquileo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

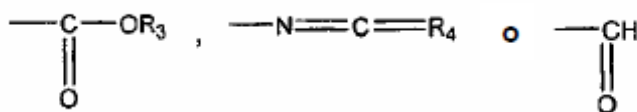


o



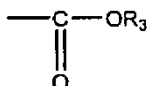
- 35 en los que n y o son números enteros 0 a 6, y m es un número entero de 1 a 6 en el compuesto de fórmula II-A y/o el compuesto de fórmula II-B.

5. Un inmunoanálisis de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores, en el que X es



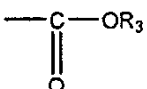
en el que R₃ es hidrógeno o, tomado junto con su átomo de oxígeno unido, forma un éster reactivo, y R₄ es oxígeno o azufre en el compuesto de fórmula II-A y/o el compuesto de fórmula II-B.

- 5 6. Un inmunoanálisis de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores, en el que X es



y R₃ es hidrógeno en el compuesto de fórmula II-A y/o el compuesto de fórmula II-B.

7. Un inmunoanálisis de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 5, en el que X es

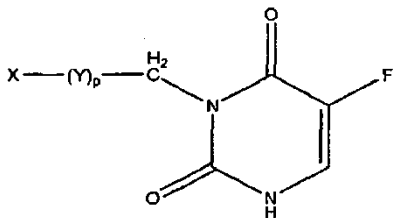


- 10 y R₃ forma un éster reactivo en el compuesto de fórmula II-A y/o el compuesto de fórmula II-B.

8. Un inmunoanálisis de acuerdo con el aspecto 7, en el que el éster formado es un alquilester inferior, imidoéster o amidoéster en el compuesto de fórmula II-A y/o el compuesto de fórmula II-B.

- 15 9. Un inmunoanálisis de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores, en el que la muestra es una muestra humana.

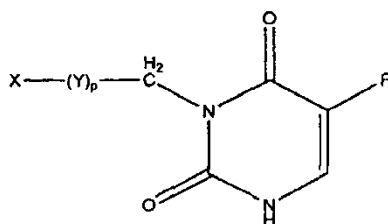
- 20 10. Un inmunoanálisis de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores, en el que dicho anticuerpo se genera a partir de un inmunógeno que comprende un vehículo inmunogénico que contiene un polímero de poliamina conjugado con un compuesto de fórmula:



II-A

en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8.

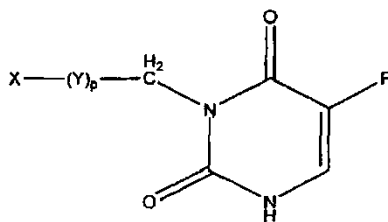
- 25 11. Un inmunoanálisis de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores, en el que el anticuerpo está unido a un soporte sólido.
12. Un inmunoanálisis de acuerdo con el aspecto 11, en el que el soporte sólido es placas de microtitulación.
- 30 13. Un inmunoanálisis de acuerdo con el aspecto 11, en el que el soporte sólido es nanopartículas.
14. Un anticuerpo que se une selectivamente a 5-fluoro-uracilo y no se une sustancialmente con el tegafur.
- 35 15. Un anticuerpo de acuerdo con el aspecto 14, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
16. Un anticuerpo de acuerdo con el aspecto 14 o el aspecto 15, en el que dicho anticuerpo se obtiene de ratones, conejos o ratas.
- 40 17. Un anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 14 a 16, en el que dicho anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con uracilo ni con citosina.
18. Un anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 14 a 17, en el que dicho anticuerpo se obtiene de un vehículo inmunogénico que contiene un polímero de poliamina conjugado con un compuesto de fórmula:



II-A

en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8.

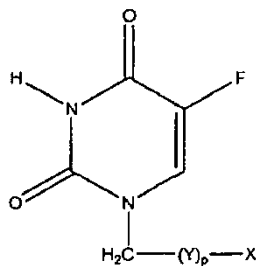
19. Un compuesto de fórmula:



II-A

5

en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8, o un compuesto de fórmula:

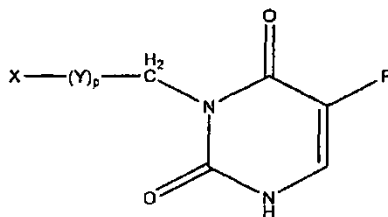


II-B

10

en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8, o una mezcla de los mismos.

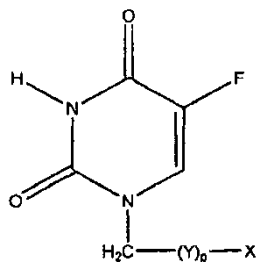
20. Un conjugado de un vehículo con un compuesto de fórmula:



II-A

15

en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8, o un compuesto de fórmula:



II-B

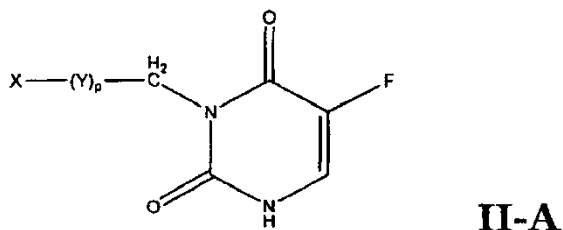
en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8, o una mezcla de los mismos.

20

21. Un conjugado de acuerdo con el aspecto 20, en el que el vehículo contiene uno o más grupos amino ligados

por -C- o -NH-C-, en el que R₄ es oxígeno o azufre.

22. Un inmunógeno que contiene un vehículo inmunogénico que contiene un polímero de poliamina ligado a un compuesto de fórmula:



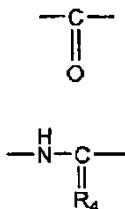
5

en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8.

23. Un inmunógeno de acuerdo con el aspecto 22, en el que el polímero inmunogénico contiene uno o más grupos amino ligados por

10

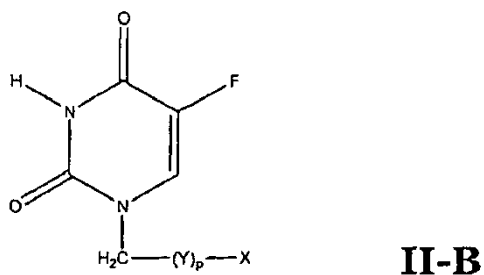
o



en el que R₄ es oxígeno o azufre.

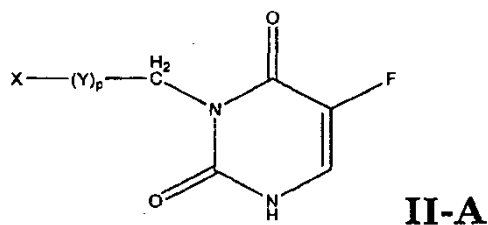
15

24. Un kit para determinar la presencia de 5-fluoro-uracilo en una muestra de un paciente que comprende reactivos en recipientes separados, siendo uno de los reactivos un conjugado de un vehículo con un compuesto de fórmula:



20

en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8, o un compuesto de fórmula:



25

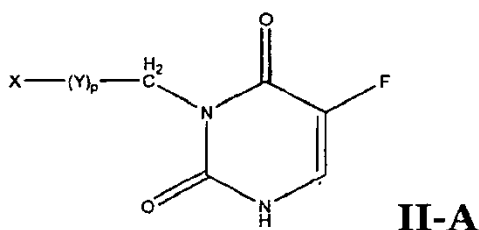
en la que X, Y y p son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8, o una mezcla de los mismos; y conteniendo el segundo recipiente un anticuerpo sustancialmente selectivamente reactivo con 5-fluoro-uracilo y no sustancialmente reactivo de forma cruzada con tegafur.

30

25. Un kit de acuerdo con el aspecto 24, en el que dicho conjugado está presente en una cantidad predeterminada en dicho primer recipiente.

26. Un kit de acuerdo con el aspecto 24 o el aspecto 25, en el que dicho kit se usa para determinar la cantidad de 5-fluoro-uracilo en dicha muestra.

27. Un kit de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 24 a 26, en el que dicho anticuerpo se genera a partir de un inmunógeno de un polipéptido de poliamina inmunogénica ligado a un compuesto de fórmula:



en la que p, X y Y son como se han definido en uno cualquiera de los aspectos 1 a 8.

5

Ejemplos

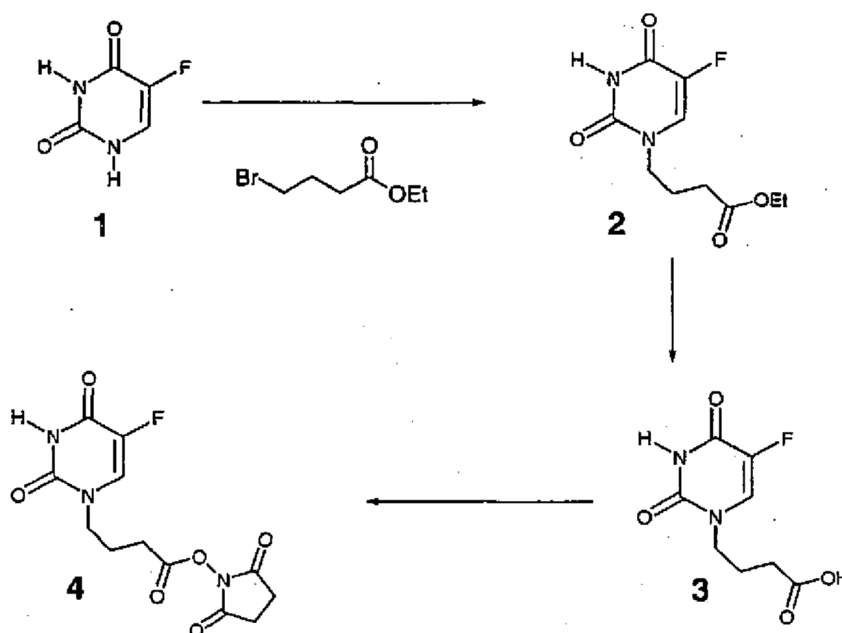
En los ejemplos, se usan las siguientes abreviaturas para designar los siguientes términos:

THF	tetrahidrofurano
EA	alcohol etílico
DCM	diclorometano
DMAP	dimetilaminopiridina
NHS	N-hidroxi-succinimida
EDC	clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
CCF	cromatografía de capa fina
ANS	ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico
i.p.	Intraperitoneal
HRP	peroxidasa de rábano picante
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TRIS	clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
ASB	albúmina de suero bovino
TGB	tiroglobulina bovina
PBS	solución salina tamponada con fosfato
di.	agua desionizada

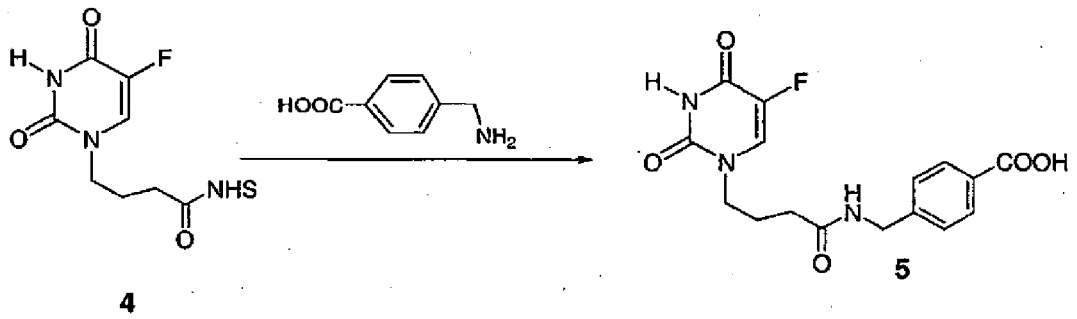
10

En los ejemplos, el Esquema 1, el Esquema 2, los Esquemas 3a y 3b, y el Esquema 4 que figuran a continuación presentan los compuestos específicos preparados y designados por los números de los ejemplos. Los esquemas son los siguientes:

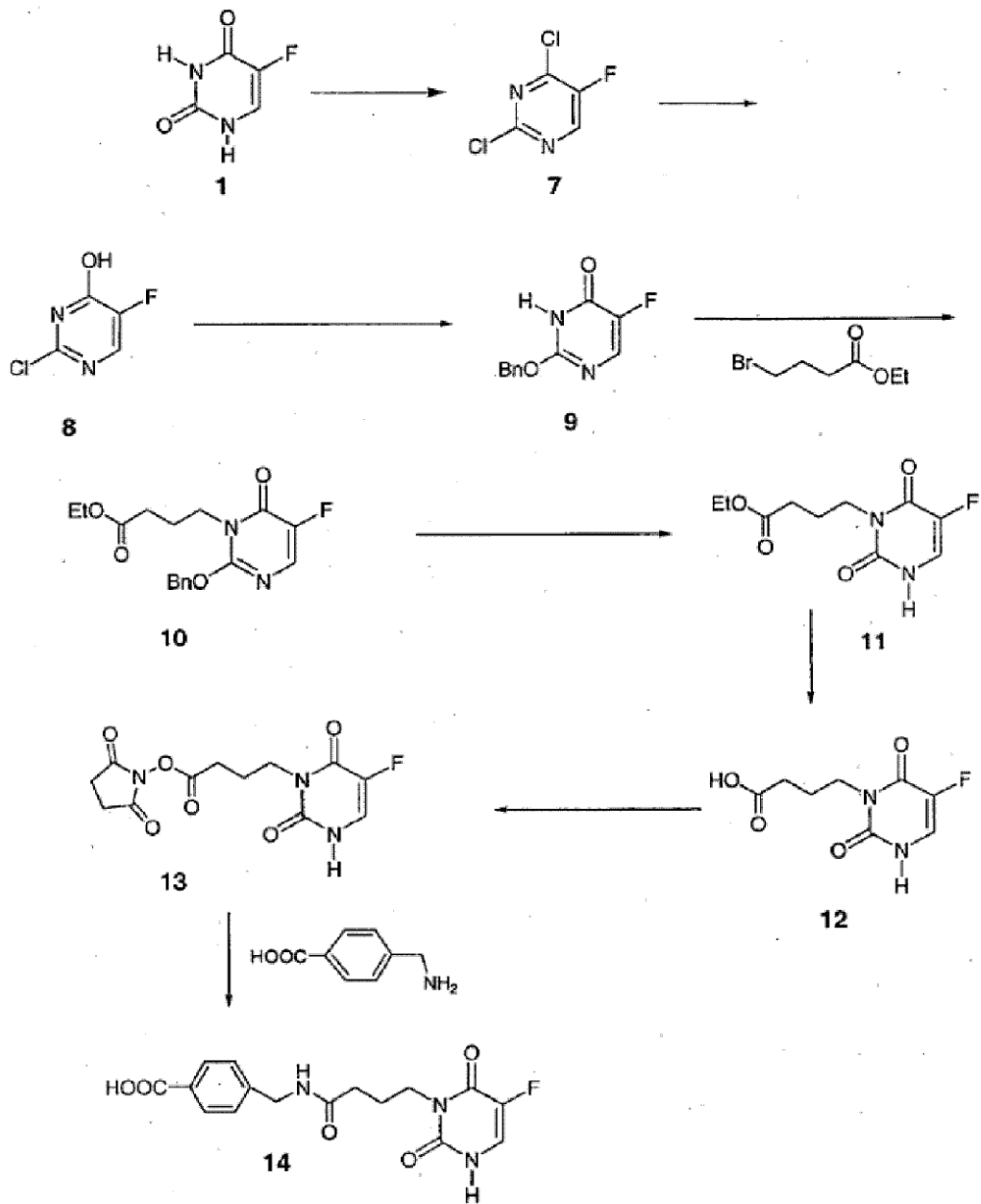
Esquema 1

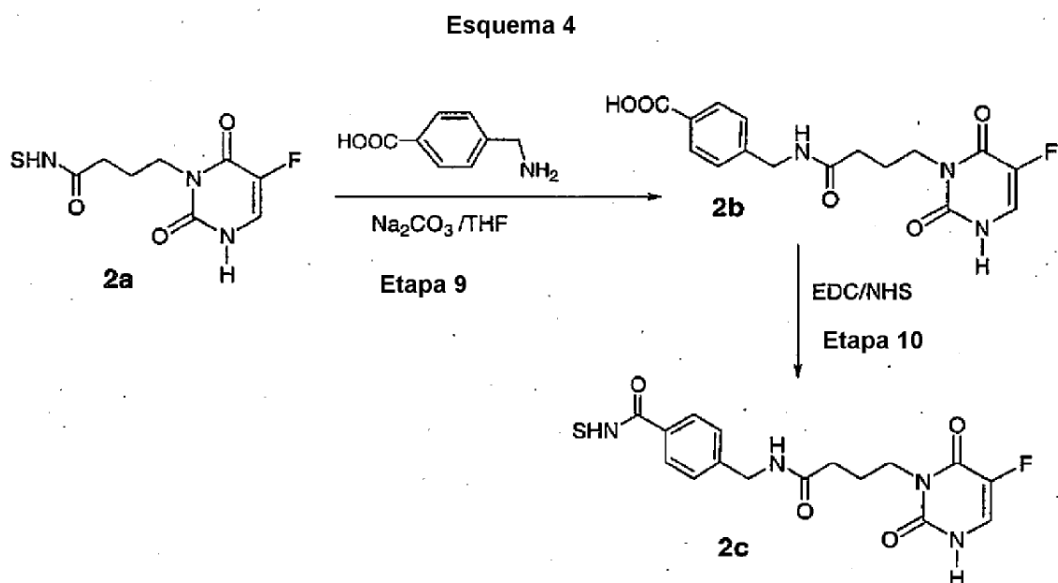
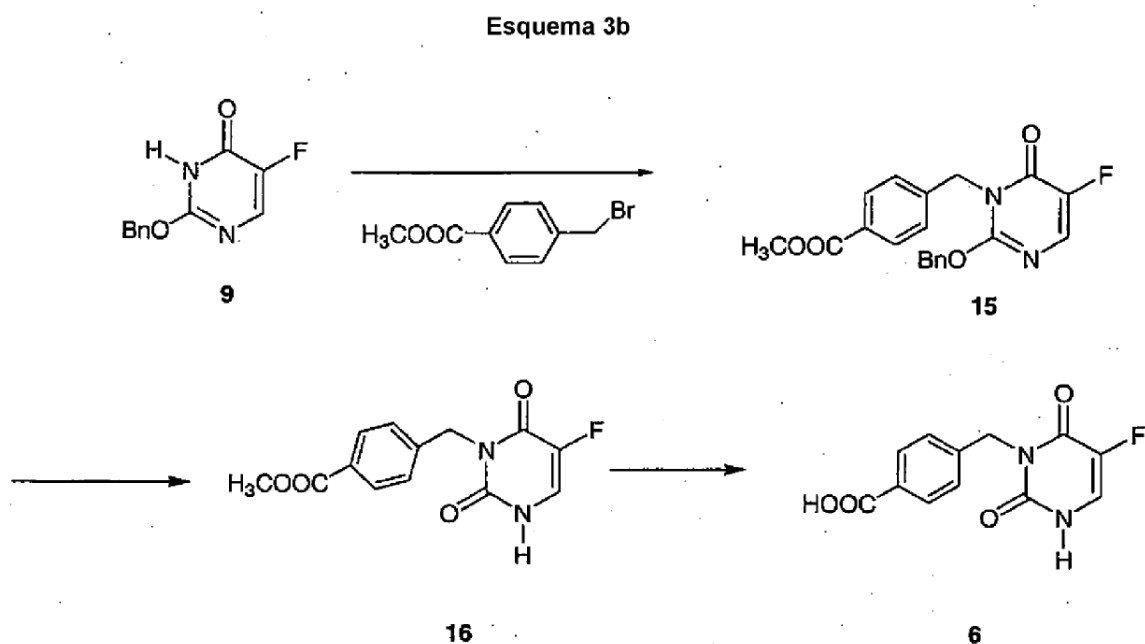


Esquema 2



Esquema 3a





Ejemplo 1

5 Esquema 1. Preparación de éster activado de 5-FU 1-substituido [4]

A una solución de fluorouracilo (50 g) [1] en DMF (100 ml), se añadió trietilamina (78 g) a 30 °C mientras se agitaba. A continuación, se añadió 4-bromobutirato de etilo (88,5 g) en gotas. Tras completar la adición, se agitó la mezcla de reacción resultante durante 48 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se cristalizó el residuo en acetato de etilo, produciendo 26 g (29 %) del compuesto [2].

A una solución de [2] (20 g) en metanol (100 ml), se añadió solución acuosa de hidróxido de potasio al 20 % (27 ml). Se agitó la solución resultante a temperatura ambiente durante 3 horas, y después se concentró la mezcla a presión reducida. Se disolvió el residuo en acetona (50-100 ml) y se ajustó hasta un pH 2~3 con HCl concentrado. Después se filtró y se lavó con acetona. Se disolvió el producto sólido en acetona (50 ml) mediante calentamiento. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se precipitó el sólido mediante la adición de acetato de etilo (100 ml). Se recogió el

producto sólido mediante filtración, seguida de secado, produciendo aproximadamente 10 g de [3]. Las condiciones de la CCF para el éster fueron acetato de etilo:éter (3:1). Las condiciones de la CCF para el ácido fueron cloroformo:metanol (15:1) con 2 gotas de ácido acético.

- 5 A 6,3 g de compuesto [3] en 600 ml de diclorometano a 0 °C, se añadió NHS. Se añadió a esto una solución de DCC (4,8 g) en diclorometano en gotas. Tras agitar durante 2 horas a 0 °C, se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 15 horas. Se concentró la mezcla de reacción. Se cristalizó el residuo en acetona, dando el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto en una columna de gel de sílice (eluyendo con acetato de etilo:éter, 3:1), produciendo 4 g del compuesto [4].

10

Ejemplo 2

Esquema 2. Preparación de ácido de 5-FU 1-substituido [5]

- 15 A una solución del compuesto [4] (3,2 g) en acetonitrilo (300 ml), se añadió agua (900 ml), seguida de la adición de 1,2 eq. de ácido *p*-metilaminobenzoico. Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 20 horas. Se concentró la mezcla a presión reducida para eliminar el acetonitrilo. Se formó un precipitado y se recogió mediante filtración. Se cristalizó luego en acetona, dando 2,8 g de producto en bruto. Se purificó el producto en bruto en una columna de gel de sílice (eluyendo con cloroformo:metanol, 15:1 con 1-2 gotas de ácido acético), produciendo 2 g del compuesto [5].

20

Ejemplo 3a

Esquema 3a. Preparación de derivados de ácido de 5-FU 3-substituido [12], [14]

25

Se agitó una mezcla de 15,6 g de 5-FU [1] en 80 ml de POCl₃ en un matraz de tres bocas dotado de un condensador, un termómetro y embudo de decantación a 40 °C. Tras la adición de 25 ml de *N,N*-dimetilanimilina en gotas, se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 3 horas. Se evaporó el exceso de POCl₃ a presión reducida. Se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente y se vertió en 75 g de hielo picado. A continuación, se extrajo con cloroformo (50 ml tres veces). Se lavaron los extractos combinados con agua, se secaron con MgSO₄ y se concentraron, dando un sólido amarillento del compuesto [7] con un rendimiento del aproximadamente 50 %.

30

Se agitó una mezcla de 16 g de oxiclورو [7] en una solución 48 ml de NaOH 2 N a 45 °C durante una hora. Se redujo el pH de la mezcla de reacción hasta 7. Se añadió otra solución de 48 ml de NaOH 2 N y se continuó agitando hasta que se dejaron de observar materiales oleaginosos en la mezcla de reacción. Una vez enfriada la mezcla hasta la temperatura ambiente, se ajustó el pH hasta un pH 3 con HCl concentrado. Se enfrió y el producto [8] precipitó. Se recogió compuesto de oxiclورو [8] y se lavó con agua hasta que la solución de lavado se volvió neutra. El rendimiento fue del aproximadamente 55 %.

35

- 40 A un matraz de tres bocas dotado de un condensador, un termómetro y un aparato de Dean Stark, se añadieron 20 ml de tolueno, 52 ml de alcohol bencílico y 2,44 g de NaOH sólido. Se calentó la mezcla resultante a reflujo hasta que se secó. Después, se añadieron 3 g de Compuesto [8] y se continuó a reflujo durante 3 horas. Una vez enfriada la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de agua. Se lavó la fase orgánica dos veces con agua (50 ml cada vez). Se combinaron las fases acuosas, y se eliminaron los residuos de tolueno y alcohol bencílico a presión reducida. Se ajustó la solución hasta un pH 3 con HCl concentrado, se enfrió y se formó un precipitado que se recogió. Se recrystalizó en etanol, produciendo el compuesto [9] con un rendimiento del aproximadamente 60 %.

45

- Tras calentar una mezcla de 20 ml de benceno, 20 ml de agua y 0,5 g de bromuro de tetrabutilamonio hasta 55 °C, se añadieron la solución A (2 g de [9] en 20 ml de solución acuosa de NaOH 1 N) y solución B (1,9 g de 4-bromobutirato de etilo en 20 ml de benceno) a la mezcla alternativamente en gotas. El pH de la mezcla de reacción se controló entre un pH 8-10. Una vez completada la adición, se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante dos horas y media. Se separó la fase orgánica, se lavó con NaOH al 5 % y agua, y se secó con MgSO₄. Se eliminó el disolvente orgánico a presión reducida. Se purificó el residuo en una columna de gel de sílice (se eluyó con éter y acetato de etilo, 10:1), dando el compuesto [10] en forma de un producto oleaginoso con un rendimiento del aproximadamente 40 %.

50

- Se agitó bajo gas hidrógeno (103,425 kPa) una mezcla de 3 g de compuesto [10] y 0,3 g de Pd/C al 10 % en 50 ml de metanol durante aproximadamente 24 horas. Se eliminó el catalizador mediante filtración. Al filtrado que contenía [10], se añadieron 2 g de NaOH y 50 ml de agua. Se agitó la mezcla resultante durante 8 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el metanol a presión reducida. Se ajustó la mezcla hasta un pH 3 con HCl concentrado. Tras enfriar, se formó un precipitado y se recogió mediante filtración. Se recrystalizó el precipitado en etanol, produciendo [12] con un rendimiento del aproximadamente 50 %.

60

- 65 Se agitó una mezcla de 1 g de [12] seco, 0,74 g de NHS, 1,47 g de DCC en 50 ml de cloroformo durante una noche (aproximadamente 24 horas) a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el

residuo en una columna de gel de sílice (eluyendo con acetato de etilo y metanol, 10:1), produciendo el compuesto [13] con un rendimiento del aproximadamente 40 %.

5 Se agitó una mezcla de 1 g de compuesto [13], 0,5 g de ácido 4-(aminometil)benzoico en 30 ml de DMF a temperatura ambiente durante 8 horas. Se añadió una porción de 150 ml de agua a la mezcla de reacción. Se lavó la mezcla resultante con 100 ml de acetato de etilo. Se dejó reposar la fase acuosa a 4 °C y se precipitó el producto [14] lentamente de la solución, se recogió mediante filtración y se secó al vacío a temperatura ambiente en presencia de P₂O₅, produciendo aproximadamente un 65 % de [14].

10 Ejemplo 3b

Esquema 3b. Preparación de derivado de ácido de 5-FU 3-sustituido [6]

15 Tras calentar una mezcla de 20 ml de benceno, 20 ml de agua y 0,5 g de bromuro de tetrabutilamonio hasta 55 °C, se añadieron simultáneamente a la mezcla una solución A (2 g de [9] en 20 ml de solución acuosa de NaOH 1 N) y una solución B (2,05 g de 4-bromobutirato de etilo en 20 ml de benceno). El pH de la mezcla de reacción se controló entre un pH 8-10. Una vez completada la adición, se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante dos horas y media. Se separó la fase orgánica, se lavó con NaOH al 5 % y agua, y se secó con MgSO₄. Se eliminó el disolvente orgánico a presión reducida. Se purificó el residuo en una columna de gel de sílice (se eluyó con éter y acetato de etilo, 10:1), dando el compuesto [15] en forma de un producto oleaginoso con un rendimiento del aproximadamente 38 %.

20 Se agitó bajo gas de hidrógeno (103,425 kPa) una mezcla de 2 g de compuesto [15] y 0,2 g de Pd/C al 10 % en 60 ml de metanol durante aproximadamente 24 horas. Se eliminó el catalizador mediante filtración. Se concentró el filtrado que contenía el compuesto [16] hasta aproximadamente 20 ml a los que se añadieron 1 g de NaOH y 20 ml de agua. Se agitó la mezcla resultante durante 8 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el metanol a presión reducida y se ajustó la mezcla hasta un pH 3 con HCl concentrado. Tras enfriar, se formó un precipitado y se recogió mediante filtración. Se recristalizó el precipitado en etanol, produciendo [6] con un rendimiento del aproximadamente 60 %.

30 Ejemplo 4

Procedimiento general para la preparación de ésteres activados de NHS a partir de los correspondientes ácidos [3, 5, 12, 14, 6]

35 A una solución agitada de NHS (1,39 mmol) en 20 ml de CH₂Cl₂ seco, se añadieron el ácido (0,695 mmol) de [3, 5, 12, 14 o 6] y EDC (2,085 mmol). Se agitó la solución durante 18 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Se detuvo la reacción mediante la adición de 3 ml de ácido clorhídrico (0,3 N) y se agitó durante 5 minutos más. Se separó la capa orgánica, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó (al vacío), produciendo un sólido blanco.

40 Ejemplo 5

Preparación de inmunógeno de 5-FU 1-sustituido y KLH

45 A 5,86 ml de KLH (31,2 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (50 mM, pH 7,5), se añadieron 0,692 ml de compuesto [4] (12,8 mg/ml en DMSO), que se preparó en el Ejemplo 1, en gotas y se ajustó el pH hasta 8,5. Se dejó agitar la mezcla durante 18 horas a temperatura ambiente. A continuación, se purificó este conjugado inmunogénico mediante diálisis y se caracterizó según procedimientos descritos anteriormente (Wu *et. al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 385-390, 1997, Li *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 896-905, 1997, Salamone *et al.*, *J. Forensic Sci.* pág. 821-826, 1998).

50 Ejemplo 6a

Preparación de inmunógeno de 5-FU 3-sustituido y TGB

55 A 11,4 ml de TGB (16,9 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (50 mM, pH 7,5), se añadieron 1,2 ml de DMSO en gotas y se comprobó que el pH era de 7,5. Se añadieron a esto 0,277 ml de compuesto [13] (52,5 mg/ml en DMSO) en gotas, que se preparó en el Ejemplo 3a y se comprobó de nuevo que el pH era de 7,5. Se dejó agitar la mezcla durante 18 horas a temperatura ambiente. A continuación, se purificó el conjugado inmunogénico mediante diálisis y se caracterizó según procedimientos descritos anteriormente (Wu *et. al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 385-390, 1997, Li *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 896-905, 1997, Salamone *et al.*, *J. Forensic Sci.* pág. 821-826, 1998).

60

Ejemplo 6b**Preparación de inmunógeno de 5-FU 3-sustituido y KLH**

5 A 8,3 ml de KLH (24,9 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (50 mM, pH 7,5), se añadieron 0,922 ml de DMSO en gotas y se comprobó que el pH era de 7,5. Se añadieron a esto 0,277 ml de compuesto [13] (52,6 mg/ml en DMSO) en gotas, que se preparó en el Ejemplo 3a y se comprobó de nuevo que el pH era de 7,5. Se dejó agitar la mezcla durante 18 horas a temperatura ambiente. A continuación, se purificó el conjugado inmunogénico mediante diálisis y se caracterizó según procedimientos descritos anteriormente (Wu *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 385-390, 1997, Li *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 10 896-905, 1997, Salamone *et al.*, *J. Forensic Sci.* pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 7a**Preparación de conjugado de 5-FU 3-sustituido y ASB (proporción 10:1) con derivado 12**

15 A 1 ml de solución de ASB (50 mg/ml) en tampón de fosfato 50 mM (50 mM, pH 7,5), se añadieron 0,111 ml de DMSO en gotas. Se añadió el éster de *N*-hidroxisuccinimida activada del compuesto [12] preparado como en el ejemplo 4 (0,045 ml de un 52,5 mg/ml en solución de DMSO) en gotas. Se dejó agitando la mezcla durante una noche a temperatura ambiente para producir el conjugado de 5-FU 3-sustituido y ASB. Se purificó este conjugado mediante diálisis y se caracterizó según procedimientos descritos anteriormente (Wu *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 385-390, 1997, Li *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 896-905, 1997, Salamone *et al.*, *J. Forensic Sci.* pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 7b**Preparación de conjugado de 5-FU 3-sustituido y ASB (proporción 1:1) con derivado 6**

25 A 20,0 ml de ASB (50,0 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (50 mM, pH 7,5), se añadieron 2,222 ml de DMSO en gotas y se comprobó que el pH era de 7,5. Se añadieron a esto 0,272 ml de éster de *N*-hidroxisuccinimida activada del compuesto [6] (20,0 mg/ml en DMSO) en gotas, que se preparó en el Ejemplo 4 y se comprobó de nuevo que el pH era de 7,5. Se dejó agitar la mezcla durante 18 horas a temperatura ambiente. A continuación, se purificó el conjugado inmunogénico mediante diálisis y se caracterizó según procedimientos descritos anteriormente (Wu *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 385-390, 1997, Li *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 896-905, 1997; Salamone *et al.*, *J. Forensic Sci.* pág. 821-826, 1998).

Ejemplo 8**Preparación de conjugado de 5-FU 1-sustituido y ASB (proporción 20:1) con derivado 5**

40 A una solución de 14 ml de ASB (50 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (50 mM, pH 7,5) en un baño de hielo, se añadieron 14 ml de DMSO en gotas. Se añadió el éster de *N*-hidroxisuccinimida del compuesto [5] preparado como en el ejemplo 4 (1,65 ml de una 57 mg/ml en solución de DMSO) en gotas. Se dejó agitar la mezcla durante una noche a temperatura ambiente para producir el conjugado de 5-FU 1-sustituido y ASB. Luego se purificó este conjugado mediante diálisis y se caracterizó según procedimientos descritos anteriormente (Wu *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 385-390, 1997, Li *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 8: pág. 896-905, 1997; Salamone *et al.*, *J. Forensic Sci.* pág. 821-826, 998).

Ejemplo 9**Preparación de anticuerpos contra el 5-FU**

50 Se inmunizaron diez ratones BALB/c hembra i.p. con 100 µg/ratón de 5-FU-KLH preparado en el ejemplo 5 o con 5-FU-TGB preparado en el Ejemplo 6a, emulsionados en adyuvante completo de Freund. Los ratones recibieron una dosis de refuerzo una vez cuatro semanas después de la inyección inicial de 100 µg/ratón de los mismos inmunógenos emulsionados en adyuvante incompleto de Freund. Diez días después del refuerzo, se obtuvieron muestras de sangre de cada ratón mediante sangría orbital. El antisuero de estas muestras de sangre contenía anticuerpos contra 5-FU evaluados en los ejemplos 12a, 13 y 14. Para los anticuerpos monoclonales, se inmunizaron diez ratones BALB/c hembras i.p. con 100 µg/ratón de 5-FU 3-sustituido-KLH preparado en el ejemplo 6b, emulsionado en adyuvante completo de Freund. Los ratones recibieron una dosis de refuerzo una vez cuatro semanas después de la inyección inicial de 100 µg/ratón de los mismos inmunógenos emulsionados en adyuvante incompleto de Freund. Diez días después del refuerzo, se obtuvieron muestras de sangre de cada ratón mediante sangría orbital y se rastrearon como en los ejemplos 12a y 15. Para producir anticuerpos monoclonales comenzando cuatro días antes de la fusión (día 0), se inyectaron a los ratones i.p. 400 µg (día 3), 200 µg (día 2) y 200 µg (día 1) de inmunógeno de 5-FU 3-sustituido-KLH en PBS en tres días sucesivos. Se aislaron células de bazo de los ratones seleccionados y se fusionaron con 2 x 10⁷ células SP2/0 con polietilenglicol 1500 al 50 % según el procedimiento de Coligan, J. E. *et al.*, eds., "Current Protocols in Immunology", 2.5.1-2.5.8, (1992), Wiley & Sons, NY. Se sembraron

las células fusionadas en diez placas de 96 pocillos en DMEM/F12 complementado con FetalClone I al 20 %, L-glutamina al 2 % (100 mM) y 50 x HAT al 2 %. Dos semanas después, se analizó la presencia de anticuerpos contra 5-FU mediante ELISA (ejemplo 12b) del sobrenadante de hibridoma. Se expandieron los pocillos positivos y se volvieron a rastrear mediante el mismo procedimiento. Se confirmó la unión a 5-FU de los clones positivos mediante ELISA competitivo (ejemplos 12a y 15). Se subclonaron una vez o dos veces los clones positivos según el ELISA mediante dilución limitante según el procedimiento revelado en Coligan, J. E. *et al.*, eds., "Current Protocols in Immunology", 2.5.8-2.5.17, Wiley & Sons, NY.

Ejemplo 10

Procedimiento de sensibilización de placas de microtitulación con conjugado de derivado 5 de 5-FU-ASB

Se realizó el procedimiento de ELISA para medir las concentraciones de 5-FU en placas de microtitulación de poliestireno (Inmunomódulos C8 o F8 MaxiSorp de Nunc) optimizadas en cuanto a la unión de proteínas y que contenían 96 pocillos por placa. Se revistió cada pocillo con conjugado de 5-FU-ASB (preparado como en el ejemplo 8) añadiendo 300 µl de conjugado de 5-FU-ASB a 10 µg/ml en bicarbonato de sodio 0,05 M, pH = 9,6, e incubando durante tres horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos con bicarbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6, y luego se bloquearon con 400 µl de sacarosa al 5 %, solución de caseinato de sodio al 0,2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar la solución de post-revestimiento, se secaron las placas a 37 °C durante una noche.

Ejemplo 11a

Procedimiento de sensibilización de placas de microtitulación con conjugado de derivado 12 de 5-FU-ASB

Se realizó el procedimiento de ELISA para medir las concentraciones de 5-FU en placas de microtitulación de poliestireno (Inmunomódulos C8 o F8 MaxiSorp de Nunc) optimizadas en cuanto a la unión de proteínas y que contenían 96 pocillos por placa. Se revistió cada pocillo con conjugado de 5-FU-ASB (preparado como en el ejemplo 7a) añadiendo 300 µl de conjugado de 5-FU-ASB a 10 µg/ml en bicarbonato de sodio 0,05 M, pH = 9,6, e incubando durante tres horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos con bicarbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6, y luego se bloquearon con 400 µl de sacarosa al 5 %, solución de caseinato de sodio al 0,2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar solución de post-revestimiento, se secaron las placas a 37 °C durante una noche.

Ejemplo 11b

Procedimiento de sensibilización de placas de microtitulación con conjugado de derivado 6 de 5-FU-ASB

Se realizó el procedimiento de ELISA para medir las concentraciones de 5-FU en placas de microtitulación de poliestireno (Inmunomódulos C8 o F8 MaxiSorp de Nunc) optimizadas en cuanto a la unión de proteínas y que contenían 96 pocillos por placa. Se revistió cada pocillo con conjugado de 5-FU-ASB (preparado como en el ejemplo 7b) añadiendo 300 µl de conjugado de 5-FU-ASB a 10 µg/ml en bicarbonato de sodio 0,05 M, pH = 9,6, e incubando durante tres horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos con bicarbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6, y luego se bloquearon con 375 µl de sacarosa al 5 %, solución de caseinato de sodio al 0,2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar solución de post-revestimiento, se secaron las placas a 37 °C durante una noche.

Ejemplo 12a

Procedimiento de rastreo de anticuerpos - Título

Se realizó el procedimiento de ELISA para rastrear anticuerpos contra el 5-FU (producidos en el ejemplo 9) con las placas de microtitulación que se habían sensibilizado con 5-FU-ASB según lo descrito en los ejemplos 7a, 7b y 8. El análisis de rastreo de los anticuerpos se realizó diluyendo los antiseros que contenían anticuerpos contra el 5-FU hasta 1:100; 1:1.000; 1:10.000 y 1:100.000 en solución salina tamponada con fosfato que contenía ASB al 0,1 % y timerosal al 0,01 %. Se añadieron a cada uno de los pocillos sensibilizados con 5-FU-ASB (preparados en los ejemplos 11a, 11b y 10) 100 µl de anticuerpo diluido y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Durante esta incubación, el anticuerpo se une con el conjugado de 5-FU en el pocillo. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9 %, Tween-80 al 0,5 % y timerosal al 0,001 %, pH 7,8, para eliminar cualquier anticuerpo sin unir. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra 5-FU unido al conjugado de 5-FU-ASB en los pocillos, se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado de anticuerpo antimurino de cabra-enzima HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/2.000 en PBS con ASB al 0,1 %, ANS al 0,05 %, timerosal al 0,01 %, capaz de unirse específicamente a inmunoglobulinas murinas y producir un producto coloreado al incubarse con un sustrato. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra antimurino-enzima HRP se une a los anticuerpos contra el 5-FU en los pocillos, se volvieron a lavar las placas tres veces para eliminar el conjugado de anticuerpo de cabra anti-murino-enzima HRP

sin unir. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado fue seguido de la adición de 100 µl de TMB (sustrato líquido de TMB, Sigma o BioF_x), un sustrato para la HRP, hasta desarrollar un color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación para el desarrollo del color, se añadieron 50 µl de solución de detención (fluoruro de sodio al 1,5 % en H₂O di.) a cada pocillo hasta detener la coloración y, tras 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm (lector de placas de Molecular Devices). La cantidad de anticuerpo en un pocillo fue proporcional a la absorbancia medida y se expresó como la dilución (título) resultante en una absorbancia de 1,5. Los títulos se determinaron representando el Log de la dilución del anticuerpo medido (eje X) frente a la absorbancia a 650 nm (eje Y) y extrapolando el título a una absorbancia de 1,5. El título determinó la concentración (dilución) del anticuerpo usada en el análisis competitivo indirecto de las placas de microtitulación descrito en los ejemplos 13, 14 y 15.

Ejemplo 12b

Procedimiento de rastreo de anticuerpos - Rastreo monoclonal

Se realizó el procedimiento de ELISA para rastrear anticuerpos contra el 5-FU (producidos en el ejemplo 9) con las placas de microtitulación que se habían sensibilizado con 5-FU-ASB según lo descrito en el ejemplo 7b. Se añadieron a cada uno de los pocillos sensibilizados con 5-FU-ASB (preparados en el ejemplo 11b) 50 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía ASB al 0,1 % y timerosal al 0,01 %, y luego se añadieron 50 µl de sobrenadante de cultivo monoclonal y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Durante esta incubación, el anticuerpo se une con el conjugado de 5-FU en el pocillo. Se lavaron los pocillos de las placas tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9 %, Tween-80 al 0,5 % y timerosal al 0,001 %, pH 7,8, para eliminar cualquier anticuerpo sin unir. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra 5-FU unido al conjugado de 5-FU-ASB en los pocillos, se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado de anticuerpo antimurino de cabra-enzima HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido hasta una actividad específica predeterminada (aproximadamente 1/2.000) en PBS con ASB al 0,1 %, ANS al 0,05 %, timerosal al 0,01 %, capaz de unirse específicamente con inmunoglobulinas murinas y producir un producto coloreado cuando al incubarse con un sustrato. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra antimurino-enzima HRP se une a los anticuerpos contra el 5-FU en los pocillos, se volvieron a lavar las placas tres veces para eliminar el conjugado de anticuerpo de cabra anti-murino-enzima HRP sin unir. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado fue seguido de la adición de 100 µl de TMB (sustrato líquido de TMB, Sigma o BioF_x), un sustrato para la HRP, hasta desarrollar un color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación para el desarrollo del color, se añadieron 50 µl de solución de detención (fluoruro de sodio al 1,5 % en H₂O di.) a cada pocillo hasta detener la coloración y, tras 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm (lector de placas de Molecular Devices). La cantidad de anticuerpo en un pocillo fue proporcional a la absorbancia medida. Las muestras con una absorbancia de más de dos veces el fondo fueron designadas positivas.

Ejemplo 13

Procedimiento de inmunoanálisis competitivo indirecto de placas de microtitulación que determina la CI₅₀ y la reactividad cruzada para los anticuerpos contra el conjugado de derivado 4 de 5-FU

Se realizó el procedimiento de ELISA para medir las concentraciones de 5-FU con las placas de microtitulación que se habían sensibilizado con 5-FU-ASB descritas en el ejemplo 7a. Se diluyeron 5-FU, uracilo, timina, citosina y tegafur diez veces en PBS en un intervalo de concentraciones de 0,01 a 10.000 ng/ml. El análisis se realizó incubando 50 µl de los analitos que se iban a medir con 50 µl de anticuerpo (producido en el ejemplo 9 con inmunógeno del ejemplo 5) diluidos hasta un título determinado en el ejemplo 12a. Durante la incubación de 10 minutos (T.A., con agitación) hay una competición de la unión del anticuerpo por el conjugado de 5-FU en el pocillo y el analito de la disolución. Tras esta incubación, se lavaron los pocillos de las placas tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9 %, Tween-80 al 0,5 % y timerosal al 0,001 %, pH 7,8, para eliminar cualquier material que no se hubiera unido. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra 5-FU unido al conjugado de 5-FU-ASB en los pocillos, se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado de anticuerpo antimurino de cabra-enzima HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/2.000 en PBS con ASB al 0,1 %, ANS al 0,05 %, timerosal al 0,01 %, capaz de unirse específicamente con inmunoglobulinas murinas y producir un producto coloreado al incubarse con un sustrato. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra antimurino-enzima HRP se une a los anticuerpos contra el 5-FU en los pocillos, se volvieron a lavar las placas tres veces para eliminar el conjugado secundario no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado fue seguido de la adición de 100 µl de TMB (sustrato líquido de TMB, Sigma o BioF_x), un sustrato para la HRP, hasta desarrollar un color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación para el desarrollo del color, se añadieron 50 µl de solución de detención (fluoruro de sodio al 1,5 % en H₂O di.) a cada pocillo hasta detener la coloración y, tras 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm (lector de placas de Molecular Devices). La cantidad de anticuerpo en un pocillo fue proporcional a la absorbancia medida e inversamente proporcional a la cantidad de 5-FU de la muestra. Se comparó la absorbancia del color en los pocillos que contenían analito con la de los que no tenían analito y se generó una curva estándar. El valor de la CI₅₀ para un analito dado fue definido como la concentración de analito que es necesaria para inhibir el

5 50 % de la absorbancia para los pocillos que no contienen analito. Se calculó la reactividad cruzada de un analito dado como la proporción entre la CI_{50} para el 5-FU y la CI_{50} para el uracilo, la timina, la citosina y el tegafur expresadas como un porcentaje. Cuando se midió con un anticuerpo como el producido en el ejemplo 9 con inmunógeno del ejemplo 5, el porcentaje de reactividades cruzadas relativas al 5-FU para el uracilo, la timina y la citosina resultaron ser menores del 7 % y del 200 % para el tegafur. En la tabla I, figuran los resultados.

Ejemplo 14

Procedimiento de inmunoanálisis competitivo indirecto de placas de microtitulación que determina la CI_{50} y la reactividad cruzada para los anticuerpos contra el conjugado de derivado 13 de 5-FU

10 Se realizó el procedimiento ELISA para medir las concentraciones de 5-FU con las placas de microtitulación que se habían sensibilizado con 5-FU-ASB descritas en el ejemplo 8. Se diluyeron 5-FU, uracilo, timina, citosina y tegafur diez veces en PBS en un intervalo de concentraciones de 0,01 a 10.000 ng/ml. El análisis se realizó incubando 50 μ l de los analitos que se iban a medir con 50 μ l de anticuerpo (producido en el ejemplo 9) diluidos hasta un título determinado en el ejemplo 12a. Durante la incubación de 10 minutos (T.A., con agitación) hay una competición de la unión del anticuerpo por el conjugado de 5-FU en el pocillo y el analito de la solución. Tras esta incubación, se lavaron los pocillos de la placa tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9 %, Tween-80 al 0,5 % y timerosal al 0,001 %, pH 7,8, para eliminar cualquier material que no se hubiera unido. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra 5-FU unido al conjugado de 5-FU-ASB en los pocillos, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de conjugado de anticuerpo antimurino de cabra-enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido 1/2.000 en PBS con ASB al 0,1 %, ANS al 0,05 %, timerosal al 0,01 %, capaz de unirse específicamente con inmunoglobulinas murinas y producir un producto coloreado cuando al incubar con un sustrato. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra antimurino-enzima HRP se une a los anticuerpos contra el 5-FU en los pocillos, se volvieron a lavar las placas tres veces para eliminar el conjugado secundario no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado fue seguido de la adición de 100 μ l de TMB (sustrato líquido de TMB, Sigma o BioF_x), un sustrato para la HRP, hasta desarrollar un color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación para el desarrollo del color, se añadieron 50 μ l de solución de detención (fluoruro de sodio al 1,5 % en H₂O di.) a cada pocillo hasta detener la coloración y, tras 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm (lector de placas de Molecular Devices). La cantidad de anticuerpo en un pocillo fue proporcional a la absorbancia medida e inversamente proporcional a la cantidad de 5-FU de la muestra. Se comparó la absorbancia del color en los pocillos que contenían analito con la de los que no tenían analito y se generó una curva estándar. El valor de la CI_{50} para un analito dado fue definido como la concentración de analito que es necesaria para inhibir el 50 % de la absorbancia para los pocillos que no contienen analito. Se calculó la reactividad cruzada de un analito dado como la proporción entre la CI_{50} para el 5-FU y la CI_{50} para el uracilo, la timina, la citosina y el tegafur expresadas como un porcentaje. Cuando se midió con un anticuerpo como el producido en el ejemplo 9 con inmunógeno del ejemplo 6a, el porcentaje de reactividades cruzadas relativas al 5-FU para el uracilo fue menor del 8 %, para la citosina, menor del 0,03 %, menor del 1 % para el tegafur y del aproximadamente 12 % para la timina. En la tabla I, figuran los resultados.

Ejemplo 15

Procedimiento de inmunoanálisis competitivo indirecto de placas de microtitulación que determina la CI_{50} y la reactividad cruzada para los anticuerpos contra el conjugado de derivado 13 de 5-FU

45 Se realizó el procedimiento de ELISA para medir las concentraciones de 5-FU con las placas de microtitulación que se habían sensibilizado con 5-FU-ASB descritas en el ejemplo 7b. Se diluyeron 5-FU, uracilo, timina, citosina y tegafur diez veces en PBS en un intervalo de concentraciones de 0,1 a 1.000.000 ng/ml dependiendo de la muestra. El análisis se realizó incubando 50 μ l de los analitos que se iban a medir con 50 μ l de anticuerpo (producido en el ejemplo 9) diluidos hasta un título determinado en el ejemplo 12a. Durante la incubación de 10 minutos (T.A., con agitación) hay una competición de la unión del anticuerpo por el conjugado de 5-FU en el pocillo y el analito de la solución. Tras esta incubación, se lavaron los pocillos de la placa tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9 %, Tween-80 al 0,5 % y timerosal al 0,001 %, pH 7,8, para eliminar cualquier material que no se hubiera unido. Para detectar la cantidad de anticuerpo contra 5-FU unido al conjugado de 5-FU-ASB en los pocillos, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de conjugado de anticuerpo antimurino de cabra-enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido hasta una actividad específica predeterminada (aproximadamente 1/2.000) en PBS con ASB al 0,1 %, ANS al 0,05 %, timerosal al 0,01 %, capaz de unirse específicamente con inmunoglobulinas murinas y producir un producto coloreado al incubar con un sustrato. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la cual el conjugado de anticuerpo de cabra antimurino-enzima HRP se une a los anticuerpos contra el 5-FU en los pocillos, se volvieron a lavar las placas tres veces para eliminar el conjugado secundario no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado fue seguido de la adición de 100 μ l de TMB (sustrato líquido de TMB, Sigma o BioF_x), un sustrato para la HRP, hasta desarrollar un color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación para el desarrollo del color, se añadieron 50 μ l de solución de detención (fluoruro de sodio al 1,5 % en H₂O di.) a cada pocillo hasta detener la coloración y, tras 10 segundos de agitación, se determinó la absorbancia a 650 nm (lector de placas de Molecular Devices). La cantidad de anticuerpo en un pocillo fue proporcional a la absorbancia medida e inversamente proporcional a la cantidad de 5-FU de la

muestra. Se comparó la absorbancia del color en los pocillos que contenían analito con la de los que no tenían analito y se generó una curva estándar. El valor de la CI_{50} para un analito dado fue definido como la concentración de analito que es necesaria para inhibir el 50 % de la absorbancia para los pocillos que no contienen analito. Se calculó la reactividad cruzada de un analito dado como la proporción entre la CI_{50} para el 5-FU y la CI_{50} para el uracilo, la timina, la citosina y el tegafur expresadas como un porcentaje. Cuando se midió con un anticuerpo monoclonal como el producido en el ejemplo 9 con inmunógeno del ejemplo 6b, el porcentaje de reactividades cruzadas relativas al 5-FU para el uracilo fue menor del 8 %, menor del 0,01 % para la citosina, del aproximadamente 1 % para el tegafur y menor del 4 % para la timina. En la tabla II, figuran los resultados.

10 Tabla 1: Reactividad cruzada de inmunoanálisis de 5-fluorouracilo con compuestos relacionados usando anticuerpos policlonales

Sistemas de inmunoanálisis		Reactividad cruzada				
Inmunógeno	Conjugado de revestimiento de placas	5-Fluorouracilo	Uracilo	Timina	Citosina	Tegafur
Inmunógeno de KLH 1-sustituido (Esquema 1, Comp. 4, Ejemplo 5) Compuesto II-B	Conjugado de ASB 3-sustituido (proporción de 10:1) (Esquema 3a, Comp. 12, Ejemplo 7a) Compuesto II-A	100,0 %	4,0 %	6,7 %	< 0,1 %	200,0 %
Inmunógeno de TGB 3-sustituido (Esquema 3a, Comp. 12, Ejemplo 6a) Compuesto II-A	Conjugado de ASB 1-sustituido (proporción de 20:1) Comp. 5, Ejemplo 8) Compuesto II-B	100,0 %	7,5 %	12,0 %	< 0,3 %	0,5 %

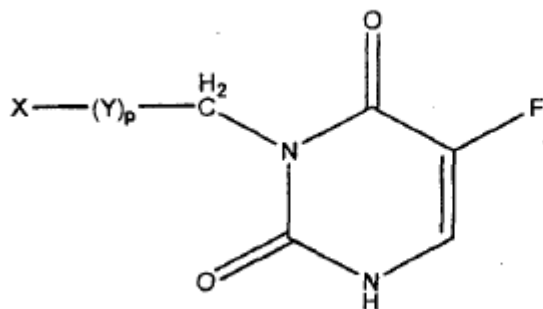
15 Tabla 2: Reactividad cruzada de inmunoanálisis de 5-fluorouracilo usando un anticuerpo monoclonal frente a KLH 3-sustituida (Ejemplo 6b) con conjugado de compuesto de 5-FU 3-sustituido-ASB de revestimiento de placas (ejemplo 7b)

Sistemas de inmunoanálisis		Reactividad cruzada				
Inmunógeno	Conjugado de revestimiento de placas	5-Fluorouracilo	Uracilo	Timina	Citosina	Tegafur
Inmunógeno de KLH 3-sustituido (Esquema 3a, Comp. 12, Ejemplo 6b) Compuesto II-A	Conjugado de ASB 3-sustituido (Esquema 3b, Comp. 6, Ejemplo 7b) Compuesto II-A	100,0 %	7,3 %	3,2 %	< 0,01 %	1,0 %

Los resultados de estas tablas demuestran la importancia de formar el inmunógeno a partir del compuesto de fórmula II-A y el reactivo a partir del compuesto de fórmula II-A o II-B. A partir de estos resultados, se puede ver que es cuando se forma el inmunógeno a partir del compuesto de fórmula II-A, en lugar de a partir de II-B, que se produce un anticuerpo que no reacciona de forma cruzada con el tegafur. Es a través del anticuerpo proporcionado a partir del inmunógeno del compuesto de fórmula II-A y el vehículo reactivo proporcionado a partir del compuesto de II-A o II-B, que se produce un inmunoanálisis preciso para el 5-FU con el fin de hacer un seguimiento de los pacientes que están siendo tratados con el 5-FU.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de un vehículo con un compuesto de fórmula:



II-A

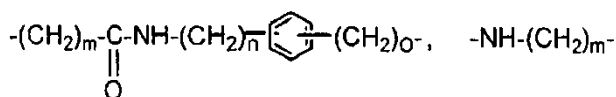
5 en la que Y es un grupo espaciador orgánico;
X es un grupo funcional terminal capaz de unirse al vehículo; y
p es un número entero de 0 a 1.

2. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que p es 0.

10

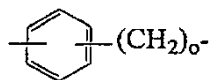
3. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que p es 1.

4. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que Y es alquileo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,



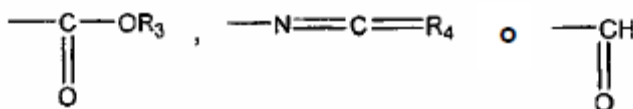
15

o



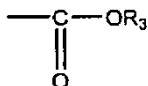
en los que n y o son números enteros 0 a 6, y m es un número entero de 1 a 6.

20 5. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X es



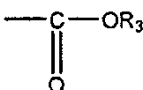
en el que R₃ es hidrógeno o, tomado junto con su átomo de oxígeno unido, forma un éster reactivo, y R₄ es oxígeno o azufre.

25 6. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X es



y R₃ es hidrógeno.

7. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que X es



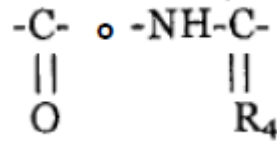
30

y R₃ forma un éster reactivo.

8. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el éster formado es un alquiléster inferior, un imidoéster o un amidoéster.

35

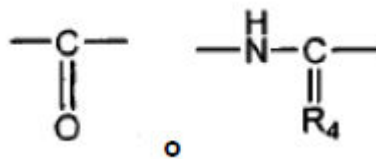
9. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el vehículo contiene uno o más grupos amino ligados por



en el que R₄ es oxígeno o azufre.

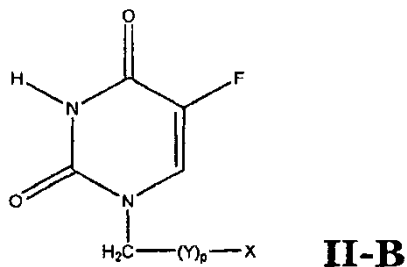
5 10. Un inmunógeno que contiene un vehículo inmunogénico que contiene un polímero de poliamina ligado a un compuesto de fórmula II-A como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

11. Un inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el polímero inmunogénico contiene uno o más grupos amino ligados por

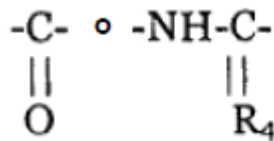


10 en el que R₄ es oxígeno o azufre.

12. Un conjugado de un vehículo con un compuesto de fórmula II-B:

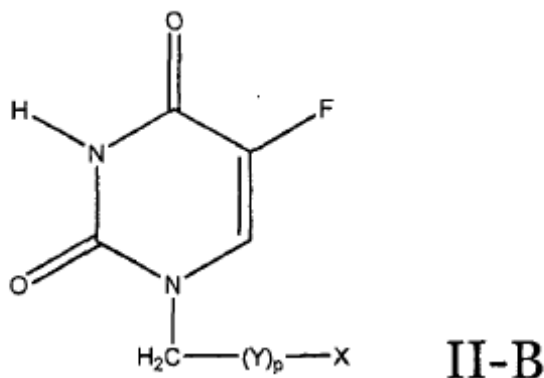


15 en la que X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y el vehículo es una partícula sólida o un polímero inmunogénico que contiene uno o más grupos amino ligados por



20 en el que R₄ es oxígeno o azufre.

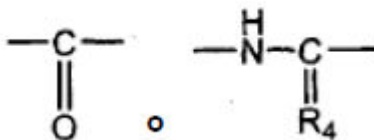
13. Un inmunógeno que contiene un vehículo inmunogénico que contiene un polímero de poliamina ligado a un compuesto de fórmula II-B:



en la que X, Y y p son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

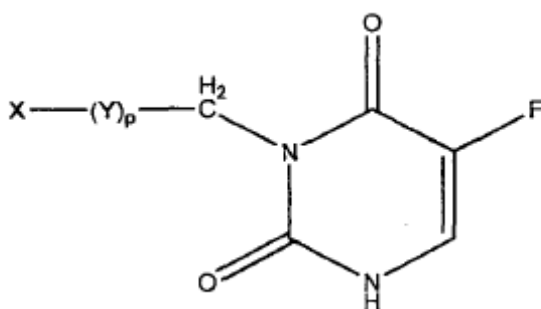
14. Un inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el polímero inmunogénico contiene uno o más grupos amino ligados por

5



en los que R₄ es oxígeno o azufre.

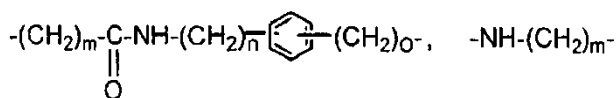
15. Un compuesto de fórmula:



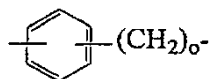
II-A

10

en la que Y es alquileno que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,



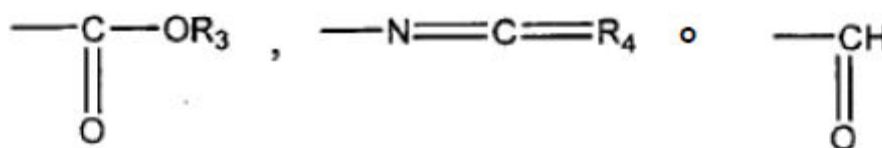
o



15

en los que n y o son números enteros de 0 a 6, y m es un número entero de 1 a 6; X es un grupo funcional terminal capaz de unirse al vehículo; y p es 1.

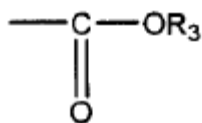
16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15, en el que X es



20

en los que R₃ es hidrógeno o, tomado junto con su átomo de oxígeno unido, forma un éster reactivo, y R₄ es oxígeno o azufre.

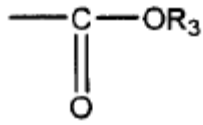
17. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que X es



25

y R₃ es hidrógeno.

18. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que X es



y R₃ forma un éster reactivo.

5

19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el éster formado es un alquiléster inferior, un imidoéster o un amidoéster.