

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 603**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01) **C07H 5/04** (2006.01)  
**G01N 33/546** (2006.01)  
**G01N 33/532** (2006.01)  
**G01N 33/533** (2006.01)  
**G01N 33/534** (2006.01)  
**C12P 7/00** (2006.01)  
**C07K 1/10** (2006.01)  
**C07K 1/13** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07H 9/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2005 E 05811842 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 1805514**

54 Título: **Inmunoensayos para topiramato**

30 Prioridad:

**25.10.2004 US 621770 P**  
**20.10.2005 US 254507**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.12.2014**

73 Titular/es:

**SERADYN INC. (100.0%)**  
**46360 Fremont Blvd.**  
**Fremont, California 94538, US**

72 Inventor/es:

**OUYANG, ANLONG y**  
**ARABSHAH, LILI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 524 603 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

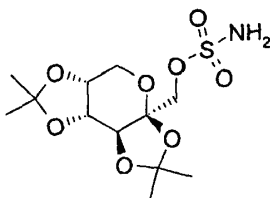
Inmunoensayos para topiramato

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a reactivos inmunodiagnósticos para topiramato y a protocolos. Más particularmente, la presente invención se refiere a topiramato, análogos de topiramato, inmunógenos y antígenos preparados a partir de análogos de topiramato, anticuerpos preparados a partir de inmunógenos basados en topiramato y a procedimientos de fabricar y usar los mismos.

**2. Tecnología relacionada**

15 El topiramato está representado químicamente como sulfamato de 2,3:4,5-bis-O-(1-metil-etiliden-β-D-fructopiranososa o sulfamato de 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-beta-D-fructopiranososa, que se muestra a continuación. El topiramato es un fármaco antiepiléptico ("FAE") y no está químicamente relacionado con muchos FAE existentes. La FDA aprobó el topiramato, que es el principio activo de TOPAMAX<sup>®</sup>, en 1996 para su uso como terapia adyuvante en el tratamiento de adultos con convulsiones parciales con o sin generalización secundaria y también puede ser útil para el síndrome de Lennox-Gastaut y los espasmos infantiles.

**TOPIRAMATO**

25 Es bien conocido que varios fármacos, tales como los FAE, pueden tener diferentes perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos en poblaciones de pacientes diferentes, que tienen como resultado el control de fármacos terapéuticos ("CFT") de los FAE para que sean importantes vitalmente. Un objetivo de un programa de CFT es optimizar el desenlace clínico de un paciente tratando y/u optimizando un régimen de medicamentos con la ayuda de la determinación de las concentraciones del fármaco a varios tiempos tras la administración. De acuerdo con lo anterior, la dosis y el régimen del fármaco se pueden modular para un solo paciente o población de pacientes basándose en el CFT.

35 Varias características del topiramato indican que existe la necesidad clínica de individualizar la terapia para pacientes a través del uso de CFT. Se ha indicado que existen grandes variaciones entre individuos en la dosis frente a las concentraciones en suero en los pacientes. Asimismo, la variabilidad farmacocinética desempeña un papel importante en los requisitos de dosis de topiramato que son necesarias para alcanzar concentraciones séricas óptimas.

40 Se ha indicado que un intervalo adecuado de concentraciones óptimas en suero para topiramato sería de 7 a 24 μmol/l en pacientes que reciben una dosis de topiramato de 125 a 400 mg además de otros FAE. Algunos pacientes que reciben dosis considerablemente más altas, que pueden ser de hasta 2.000 mg, tenían concentraciones sistémicas de topiramato tan elevadas como de 80 μmol/l. Se puede usar un CFT eficaz para predecir regímenes de dosificación que pueden obtener concentraciones de topiramato adecuadas dentro del índice terapéutico.

45 Adicionalmente, se han realizado estudios adicionales de escalada de la dosis con topiramato con la intención de proceder a la monoterapia cuando sea posible. De acuerdo con lo anterior, se obtuvieron las concentraciones séricas valle del topiramato por la mañana y se relacionaron con el control de las convulsiones y los efectos secundarios asociados. Los resultados indicaron una clara mejoría del control de las convulsiones con una concentración en suero de topiramato en el intervalo de 15 a 75 μmol/l, pero se observó una reducción en el control de las convulsiones a concentraciones en suero superiores a 75 μmol/l. Asimismo, se produjo un incremento significativo de los efectos secundarios con concentraciones en suero superiores a 60 μmol/l. Por tanto, se ha sugerido una posible concentración en suero diana para topiramato de aproximadamente 15 a 60 μmol/l; no obstante, la mayoría de los pacientes pueden tener concentraciones en suero en los límites bajo a medio con un régimen de dosificación adecuado

55 Se han descrito muchos procedimientos para determinar la concentración sistémica del topiramato en un paciente. Véase Berry DJ, et al. Ther Drug Monit; 22:460-4 (2000). Procedimientos de cromatografía de gases por capilaridad han descrito la determinación de topiramato en suero usando detección de ionización por llama y detección

específica de nitrógeno. Véase Holland et al., J Chromatogr; 433:276-281 (1988), y Riffits et al., J Pharm Biomed Anal; 19:363-371 (1999), Tang et al., Ther Drug Monitoring; 22:195-201 (2000). Adicionalmente, se ha demostrado que los procedimientos para usar GLC o HPLC con EM miden las concentraciones de topiramato. Véase, Mozayani A, et al. J Anal Toxicol; 23:556-558 (1999), Chen S, et al., J Chromatogr; 761: 133-7 (2001), y Christensen et al., Ther Drug Monitoring; 24:658-664 (2002). No obstante, dichos procedimientos son poco prácticos para su uso comercial debido a, por ejemplo, el largo tiempo de preparación de la muestra, el largo tiempo de ensayo, los elevados costes y los procedimientos laboriosos. Por tanto, se necesita un simple y rápido procedimiento analítico para medir los niveles en plasma del topiramato para un CFT eficaz.

10 El topiramato se puede medir en plasma o suero usando un inmunoensayo FPIA (Seradyn, Inc.) disponible comercialmente. Véase la patente de EE.UU. N° 5.952.187. Aunque el inmunoensayo FPI actual es sencillo y rápido, el inmunoensayo está limitado por la poca biodisponibilidad de los análogos de topiramato anteriores y la pobre funcionalidad para el usuario.

15 Se han desarrollado técnicas de inmunoensayo para detectar varios fármacos en muestras biológicas y son adecuadas para dichas aplicaciones analíticas comerciales. De acuerdo con lo anterior, se pueden usar inmunoensayos para determinar rápidamente la cantidad de un fármaco y/o un metabolito del fármaco en la sangre de un paciente. Ejemplos de inmunoensayos pueden incluir, entre otros, inmunoensayo de micropartículas homogéneas (por ejemplo, inmunoturbidimétrico) o sistemas de microesferas cuantitativos ("QMS<sup>®</sup>"),  
20 inmunoensayos de polarización de fluorescencia ("FPIA"), inmunoensayo de enzima donante clonada ("CEDIA"), inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes ("CMIA") y similares.

De acuerdo con lo anterior, sería ventajoso disponer de inmunoensayos configurados para detectar el topiramato en la sangre, suero, plasma y/u otros fluidos o muestras biológicas de un paciente. Adicionalmente, sería ventajoso  
25 disponer de análogos de topiramato para su uso en dichos inmunoensayos y/o inmunógenos basados en análogos de topiramato para su uso en la producción de anticuerpos anti-topiramato.

El documento US5952187 divulga un análogo de topiramato derivado en el resto sulfamato o en el grupo metilo del carbono 9 o del carbono 10.

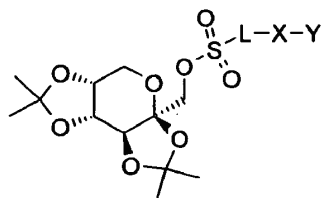
30 Faivre-Chauvet et al, (1993) Nucl. Med .Biol. 20, 763-771 divulga un enlazador-inmunoconjugado para reducir la actividad específica.

**Breve resumen de la invención**

35 En general, la presente invención se refiere a ensayos inmunodiagnósticos para topiramato. Los análogos de topiramato pueden incluir grupos operativos, tal como restos inmunogénicos que se pueden usar para preparar anticuerpos anti-topiramato, restos antigénicos que se pueden usar en ensayos inmunodiagnósticos para topiramato o restos trazadores que se pueden usar en ensayos inmunodiagnósticos. Adicionalmente, los análogos de  
40 topiramato se pueden usar en ensayos inmunodiagnósticos para competir con topiramato por anticuerpos anti-topiramato.

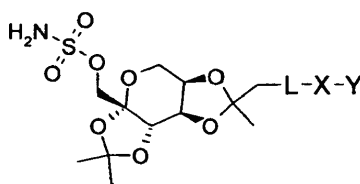
De acuerdo con la presente invención se proporciona un sistema para usar en un ensayo inmunodiagnóstico para detectar la presencia de topiramato en una muestra, el sistema comprende:

45 un anticuerpo anti-topiramato producido contra una composición inmunogénica que incluye un inmunógeno que tienen una estructura de fórmula 1, en el que L-X-Y es NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CO-Z, en el que Z es un resto inmunogénico seleccionado de uno de BSA o KLH; y



Fórmula 1

50



Fórmula 2

en las que:

L es uno del grupo  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}$ ,  $\text{NHCO}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{COO}$ , o  $\text{O}$ ;

5 X es al menos uno de un enlace entre L e Y, un grupo aromático o un grupo alifático; y

Y se selecciona del grupo que consiste en alifático, alcohol, amina, amida, ácido carboxílico, aldehído, éster, éster activado, éster alifático, imidoéster, isocianato, isotiocianato, anhídrido, tiol, tiolactona, diazonio, maleimido, NHS, O-NHS y un enlazador derivado de los mismos acoplado a un grupo operativo.

10 Adicionalmente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal y/o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo puede tener al menos uno de afinidad, especificidad o avidez por un análogo de topiramato en comparación con topiramato que sea suficiente para usar en un ensayo inmunodiagnóstico homogéneo, heterogéneo o de otro tipo. Como tal, la interacción entre el anticuerpo y el análogo de topiramato puede ser de al menos 50 % de al menos uno de afinidad, especificidad o avidez del anticuerpo por topiramato, incluso más preferentemente de al menos 70 % de al menos uno de afinidad, especificidad o avidez del anticuerpo por Imotrigina, lo más preferentemente de al menos 90 % de al menos uno de afinidad, especificidad o avidez del anticuerpo por lamotrigina. Opcionalmente, al menos uno de afinidad, especificidad o avidez del anticuerpo por un análogo de topiramato es sustancialmente igual que para topiramato.

20 En una realización, la presente invención incluye un sistema para usar en un ensayo inmunodiagnóstico para detectar la presencia de topiramato en una muestra. Dicho sistema puede incluir el análogo de topiramato y el anticuerpo anti-topiramato. Adicionalmente, uno del análogo de topiramato o anticuerpo anti-topiramato se puede acoplar con uno de una partícula, una partícula magnética, micropartícula, microesfera, soporte, donante de enzimas o aceptor de enzimas.

25 En una realización, el sistema puede incluir al menos uno de los siguientes: (a) una composición madre de topiramato; (b) una serie de composiciones que contienen topiramato a concentraciones diferentes, formando la serie de composiciones un gradiente de concentración; (c) el análogo de topiramato acoplado a un resto trazador; (d) el análogo de topiramato acoplado a una micropartícula; (e) el anticuerpo acoplado a una micropartícula; (f) el análogo de topiramato acoplado a un donante de enzimas junto con un correspondiente aceptor de enzimas; (g) el análogo de topiramato conjugado a un aceptor de enzimas junto con un correspondiente donante de enzimas; o (h) el anticuerpo acoplado a una partícula adecuada para separar mediante filtración o sedimentación.

35 La presente invención también incluye procedimientos de realizar ensayos inmunodiagnósticos para detectar la presencia de topiramato en una muestra. Dichos procedimientos pueden incluir combinar un anticuerpo anti-topiramato y un análogo de topiramato con una muestra obtenida de un sujeto al que se ha administrado previamente topiramato para formar una primera composición. A continuación se deja que cualquier topiramato libre de la muestra y el análogo de topiramato compitan por la unión con el anticuerpo. Después de la unión competitiva se detecta la unión entre el análogo de topiramato y el anticuerpo.

40 En una realización, el ensayo inmunodiagnóstico usa un análogo de topiramato que incluye un resto fluorescente y se combina con el anticuerpo y una muestra como se ha descrito. El resto fluorescente se puede excitar con luz polarizada que tiene una primera cantidad de polarización y se detecta la luz polarizada emitida del resto fluorescente que tiene una segunda cantidad de polarización. Opcionalmente, la primera cantidad de polarización se compara con la segunda cantidad de polarización y se realiza una determinación de si hay topiramato presente en la muestra, en la que si la segunda cantidad de polarización es diferente de la primera cantidad de polarización es una indicación de que hay topiramato presente en la muestra. Adicionalmente, el ensayo inmunodiagnóstico puede incluir un control combinando una cantidad conocida de topiramato con el análogo de topiramato y el anticuerpo para formar una composición de unión control. Se detecta la luz polarizada emitida del resto fluorescente en la composición de unión control que tiene una tercera cantidad de polarización y se compara con la segunda cantidad de polarización. A continuación se determina la cantidad de topiramato presente en la muestra.

55 En una realización, un ensayo inmunodiagnóstico usa un análogo de topiramato o anticuerpo acoplado a una micropartícula. El análogo, anticuerpo y la muestra se combinan una primera composición, en la que todo topiramato libre compite con el análogo por la unión con el anticuerpo. La primera composición se irradia a continuación con luz incidente y se detecta una primera intensidad de luz transmitida por la primera composición. La intensidad mínima de luz transmitida a partir de una composición de unión control que tiene el análogo de topiramato y el anticuerpo y no tiene topiramato libre se identifica y se compara con la primera intensidad de la luz transmitida. Se realiza una

determinación sobre si hay topiramato presente en la muestra, en la que si la intensidad mínima es diferente de la primera intensidad es una indicación de que hay topiramato presente en la muestra. Adicionalmente, el ensayo inmunodiagnóstico puede incluir otro control combinando una cantidad conocida de topiramato con el análogo de topiramato y el anticuerpo para formar una segunda composición de unión control. La segunda composición de unión control se irradia a continuación con luz incidente y se detecta una segunda intensidad de luz transmitida por la segunda composición de unión control. La cantidad de topiramato presente en la muestra se puede determinar después, en el que una comparación entre la primera intensidad y la segunda intensidad es una indicación de la cantidad de topiramato presente en la muestra.

En una realización, un ensayo inmunodiagnóstico usa un análogo de topiramato que tiene un donante de enzimas. El análogo, anticuerpo y la muestra se combinan una primera composición, en la que todo topiramato libre compite con el análogo por la unión con el anticuerpo. Un aceptor de enzimas y el sustrato se combinan con la primera composición, en la que el sustrato se puede escindir mediante la interacción con el donante de enzimas y el aceptor de enzimas. Después se detecta la actividad enzimática. Adicionalmente, el ensayo inmunodiagnóstico puede incluir un control combinando una cantidad conocida de topiramato con el análogo de topiramato y el anticuerpo para formar una composición de unión control, y el aceptor de enzimas y el sustrato se combinan después. La cantidad de topiramato presente en la muestra se determina mediante una comparación entre la actividad enzimática y la actividad enzimática control, lo que proporciona una indicación de la cantidad de topiramato presente en la muestra.

En una realización, un ensayo inmunodiagnóstico usa un análogo de topiramato que tiene un resto trazador y un anticuerpo acoplado con una partícula. El análogo, anticuerpo y la muestra se combinan una primera composición, en la que todo topiramato libre compite con el análogo por la unión con el anticuerpo. El anticuerpo se separa de la primera composición y todo el análogo de topiramato no unido se separa del anticuerpo. Después se detecta un resto trazador unido con el anticuerpo de la primera composición. Adicionalmente, el ensayo inmunodiagnóstico puede incluir un control combinando una cantidad conocida de topiramato con el análogo de topiramato y el anticuerpo para formar una composición de unión control. De acuerdo con lo anterior, la cantidad de topiramato presente en la muestra se puede determinar mediante una comparación entre la cantidad de resto trazador en la primera composición y la cantidad de resto trazador en la composición de unión control para proporcionar una indicación de la cantidad de topiramato presente en la muestra.

Estas y otras realizaciones y características de la presente invención serán más completamente evidentes a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas o se pueden aprender mediante la práctica de la invención, como se expone a continuación en el presente documento.

### 35 Breve descripción de las figuras

Para aclarar adicionalmente las ventajas y características anteriores y otras más de la presente invención, se dispondrá de una descripción más concreta de la invención mediante referencia a realizaciones específicas de la misma que se ilustran en las figuras adjuntas. Se aprecia que estas figuras representan únicamente realizaciones típicas de la invención y, por consiguiente, no se consideran limitantes de su alcance. La invención se describirá y explicará con especificidad y detalle adicional mediante el uso de las figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un método para preparar un anticuerpo anti-topiramato;

La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento para realizar un ensayo inmunodiagnóstico para topiramato;

La Figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un estudio de unión competitivo basado en la polarización fluorescente.

La Figura 4 es un gráfico que ilustra una realización de una curva de calibración para el topiramato;

La Figura 5 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un estudio de unión competitivo basado en la aglutinación.

La Figura 6 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un estudio de unión competitivo basado en la aglutinación;

La Figura 7 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un estudio de unión competitivo basado en actividad enzimática;

La Figura 8 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un estudio de unión competitivo basado en quimioluminiscencia;

La Figura 9 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para sintetizar un análogo de topiramato;

Las Figuras 10A y 10B son diagramas esquemáticos que ilustran una realización de protocolos de síntesis para sintetizar análogos de topiramato;

La Figura 11 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para sintetizar un análogo de topiramato;

La Figura 12 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para sintetizar un análogo de topiramato;

La Figura 13 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para

sintetizar un análogo de topiramato;

La Figura 14 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para sintetizar un análogo de topiramato;

La Figura 15 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para sintetizar un análogo de topiramato;

La Figura 16 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para sintetizar un análogo de topiramato; y

La Figura 17 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para sintetizar un análogo de topiramato;

La Figura 18 es un diagrama esquemático que ilustra una realización de un protocolo de síntesis para sintetizar un análogo de topiramato;

La Figura 19 es un diagrama esquemático que ilustra un metabolito de topiramato; y

La Figura 20 es un gráfico que ilustra la recuperación de topiramato de una realización de un inmunoensayo de aglutinación.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En general, la presente invención se refiere a análogos de topiramato y ensayos inmunodiagnósticos para topiramato. Los análogos de topiramato pueden incluir restos inmunogénicos que se pueden usar para preparar anticuerpos anti-topiramato o restos antigénicos o restos trazadores que se pueden usar en ensayos inmunodiagnósticos para topiramato. Adicionalmente, los análogos de topiramato se pueden usar en ensayos inmunodiagnósticos para competir con topiramato por anticuerpos anti-topiramato. Como tal, con la terminología siguiente se quiere describir realizaciones de la invención y no se pretende que sean limitantes.

Como se usa en el presente documento, con el término "hapteno" se pretende hacer referencia a un antígeno parcial o incompleto y puede ser una molécula o fármaco pequeño. Asimismo, un hapteno puede ser una molécula de peso molecular bajo que es una sustancia sin proteína o sin polipéptido. Normalmente, un hapteno no es capaz de estimular la formación de anticuerpos solo pero puede ser capaz de interactuar con anticuerpos. De acuerdo con lo anterior, el topiramato y análogos de topiramato de acuerdo con la presente invención pueden ser haptenos.

Como se usa en el presente documento, con el término "análogo" o "derivado" se pretende hacer referencia a un compuesto químico o molécula hecho de un compuesto o molécula parental mediante una o más reacciones químicas. Como tal, un análogo puede ser un compuesto con una estructura similar a la del topiramato o basado en un armazón de topiramato, pero diferente respecto a ciertos componentes o forma estructural, que pueden tener una acción metabólicamente similar u opuesta. Un análogo o derivado de topiramato de acuerdo con la presente invención se puede usar para competir por la unión con un anticuerpo que reconoce tanto el análogo como el topiramato. Asimismo, un análogo puede incluir un grupo operativo acoplado a topiramato a través de un grupo de unión.

Como se usa en el presente documento, los términos "inmunógeno" e "inmunogénico" quieren decir sustancias capaces de producir o generar una respuesta inmunitaria en un organismo. Un inmunógeno también puede ser un antígeno. Normalmente, un inmunógeno tiene un peso molecular bastante alto (por ejemplo, superior a 10.000), por tanto, diversas macromoléculas tales como proteínas, lipoproteínas, polisacáridos, algunos ácidos nucleicos y algunos de los ácidos teicoicos, se pueden acoplar a un hapteno con el fin de formar un inmunógeno de acuerdo con la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" quiere decir la capacidad de una molécula para inducir una respuesta inmunitaria, que se determina mediante la estructura química intrínseca de la molécula inyectada y mediante si el animal huésped puede o no reconocer el compuesto. Cambios pequeños en la estructura de un antígeno pueden alterar considerablemente la inmunogenicidad de un compuesto y se ha usado extensamente como procedimientos general para aumentar las probabilidades de producir un anticuerpo, en particular contra antígenos bien conservados. Por ejemplo, estas técnicas de modificación alteran regiones del inmunógeno para proporcionar sitios mejores para la unión a las células T o exponer nuevos epítomos para la unión a las células B.

Como se usa en el presente documento, los términos y expresiones "vehículo", "resto inmunogénico" o "vehículo inmunogénico" quieren decir una sustancia inmunogénica, habitualmente una proteína, que se puede acoplar a un hapteno. Un resto inmunogénico acoplado a un hapteno puede inducir una respuesta inmunitaria y provocar la producción de anticuerpos que se pueden unir específicamente con el hapteno. Los restos inmunogénicos son grupos operativos que incluyen proteínas, polipéptidos, glicoproteínas, polisacáridos complejos, partículas, ácidos nucleicos, polinucleótidos y similares que se reconocen como extraños y, de este modo, provocan una respuesta inmunológica del huésped. Adicionalmente, los enlazadores pueden comprender nucleótidos modificados o no modificados, nucleósidos, polímeros, azúcares y otros hidratos de carbono, poliéteres tales como, por ejemplo, polietilenglicoles, polialcoholes, polipropileno, propilenglicoles, mezclas de etilen y propilenglicoles, polialquilaminas, poliaminas tales como espermidina, poliésteres tales como poli(acrilato de etilo), polifosodiésteres y alquilenos. Un ejemplo de un grupo operativo y su enlazador es colesterol-TEG-fosforoamidita, en el que el

colesterol es el grupo operativo y el tetraetilenglicol y el fosfato sirven como enlazadores.

En un ejemplo, un vehículo inmunogénico se puede acoplar a un hapteno con el fin de estimular la inmunogenicidad y la formación de anticuerpos contra el hapteno. Normalmente, los vehículos inmunogénicos son moléculas grandes que son altamente inmunogénicas y capaces de conferir inmunogenicidad a un hapteno. Por ejemplo, se puede usar una proteína como vehículo inmunogénico porque las proteínas extrañas pueden provocar dicha respuesta inmunológica. Las proteínas vehículo pueden ser altamente solubles e incluir grupos funcionales que pueden facilitar la fácil conjugación con una molécula hapteno. Algunas de las proteínas vehículo más frecuentes de uso hoy en día son la hemocianina de lapa californiana (KLH, PM 450.000 A 13.000.000) y seroalbúmina bovina (BSA, PM 67.000). La hemocianina de lapa californiana es la proteína portadora de oxígeno de la lapa californiana marina y es extremadamente alta y exhibe una mayor inmunogenicidad cuando se disocia en subunidades, probablemente debido a la exposición de sitios ectópicos adicionales al sistema inmunológico. La BSA es una proteína altamente soluble que contiene numerosos grupos funcionales adecuados para conjugar.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" quiere decir una proteína que se produce en respuesta a la presencia de moléculas extrañas en el cuerpo. Se pueden caracterizar por su capacidad para unirse tanto a antígenos como a células o proteínas especializadas del sistema inmunológico. Los anticuerpos se dividen en cinco clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, y son inmunoglobulinas producidas por las células plasmáticas.

Como se usa en el presente documento, con el término "epítipo" se pretende definir la región de un antígeno que interacciona con un anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, una molécula u otra sustancia, que es un antígeno, puede incluir al menos un epítipo con actividad de anticuerpo. Esto puede permitir que un antígeno tenga varios epítipos reconocidos por el mismo anticuerpo o por uno diferente. Asimismo, un epítipo no es una propiedad intrínseca de cualquier estructura concreta, pero se puede definir como un sitio de unión que interacciona con el anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, con el término "afinidad" se pretende hacer referencia a una medida de la fuerza de la unión entre un epítipo y un anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, un único anticuerpo puede tener una afinidad diferente por varios epítipos. Esto puede permitir que un único anticuerpo se una fuertemente a un epítipo y con menor fuerza a otro. Como tal, un anticuerpo puede tener una primera afinidad por un fármaco, tal como topiramato, y tener una segunda afinidad por un análogo de topiramato. No obstante, es posible que el anticuerpo tenga una afinidad sustancialmente equivalente o similar tanto por topiramato como por un análogo de topiramato, que permite usar el análogo para generar anticuerpos frente a topiramato y su uso en estudios de unión competitivos. Por tanto, los análogos de topiramato de acuerdo con la presente invención se pueden usar para generar anticuerpos con afinidad por topiramato.

Como se usa en el presente documento, con el término "avidez" se pretende hacer referencia a una medida de la estabilidad global del complejo entre anticuerpos y antígenos. La estabilidad global de una interacción anticuerpo-antígeno puede estar dirigida por tres factores principales del siguiente modo: (a) la afinidad intrínseca del anticuerpo por el epítipo; (b) la valencia del anticuerpo y el antígeno; y (c) la disposición geométrica de los componentes que interaccionan. Como tal, la avidez del complejo anticuerpo-antígeno se puede modular variando los parámetros anteriores, así como otros.

Como se usa en el presente documento, con el término "especificidad" se pretende hacer referencia a la unión preferencial de un anticuerpo con un epítipo en comparación con otros epítipos disponibles. Es decir, la especificidad de un anticuerpo puede unirse preferentemente a topiramato y/o a un análogo en lugar de a un metabolito de topiramato. Esto se puede usar para generar anticuerpos anti-topiramato que se unen preferentemente a topiramato sobre sus metabolitos, de modo que se puede evaluar la verdadera concentración de topiramato porque no se contamina con la unión adversa anticuerpo-metabolito. Asimismo, la especificidad de un anticuerpo para unirse a topiramato se puede usar para adaptar análogos con una especificidad similar o sustancialmente igual que el topiramato.

Como se usa en el presente documento, con las expresiones "tasa de asociación", "tasa de disociación" o "tasa de asociación-disociación" se pretende hacer referencia a modos de describir la cinética de una interacción anticuerpo-antígeno. Es decir, con la "tasa de asociación" se pretende hacer referencia a la  $K_a$  (es decir, la constante de asociación) y con la "tasa de disociación" se pretende hacer referencia a la  $K_d$  (es decir, la constante de disociación). Cada anticuerpo tiene una  $K_a$  para un antígeno o epítipo concreto, que normalmente se denomina afinidad o fuerza de la unión. Con respecto a un anticuerpo policlonal, la "tasa de ASOCIACIÓN—DISOCIACIÓN" quiere decir una suma de muchas  $K_a$  y/o  $K_d$  diferentes para cada anticuerpo concreto que forma el anticuerpo policlonal.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo policlonal" quiere decir una mezcla heterogénea de anticuerpos con un amplio abanico de especificidades y afinidades por un antígeno o epítipo dado. Por tanto, el anticuerpo policlonal, que también se puede denominar anticuerpos policlonales, puede incluir una pluralidad de anticuerpos, cada uno distinguible de los otros, que se unen o, de otro modo interaccionan, con un antígeno. Los diferentes anticuerpos que comprenden un anticuerpo policlonal se pueden producir o generar inyectando un

inmunógeno que tiene un epítipo en un animal y, después de un tiempo adecuado, recoger y opcionalmente purificar la fracción de sangre que contiene los anticuerpos de interés. A la hora de producir anticuerpos se pueden considerar varios parámetros con respecto al uso final del anticuerpo policlonal. Estos parámetros incluyen los siguientes: (1) la especificidad del anticuerpo (es decir, la capacidad para distinguir entre antígenos); (2) la avidéz del anticuerpo (es decir, la fuerza de la unión a un epítipo); y (3) el título del anticuerpo, que determina la dilución óptima del anticuerpo en el sistema de ensayo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" quiere decir un anticuerpo que se aísla de un cultivo de células normales productoras de anticuerpos y una célula progenitora. Un anticuerpo monoclonal puede tener una constante de unión homogénea y es bien conocido en la técnica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "título de anticuerpo" quiere decir el recíproco de la dilución en suero. Los títulos se indican de este modo para notificar y formatear de forma más conveniente. El título de 1/50.000 significa que el anticuerpo detecta con eficacia el epítipo de un antígeno cuando se unen cuando el antígeno está a una dilución de 1:50.000. El título se calcula mediante titulación de punto final que tiene aproximadamente un 10 % de la DO máxima.

Como se usa en el presente documento, el término "Umáx" quiere decir la unión máxima entre un anticuerpo y un ligando (p. ej., análogo, antígeno, marcador, etc.) con independencia de título. Asimismo, la Umáx puede estar relacionada con la avidéz, pero también puede ser independiente de la avidéz, y se puede usar en una evaluación para determinar lo bien que se puede unir un anticuerpo a un ligando y dar señales mensurables. Adicionalmente, la Umáx se puede determinar como la absorbancia máxima de cada muestra y se usa para calcular la Bo. El valor de la Umáx puede variar a valores tan altos como 3-4 DO y puede ser superior para un programa de anticuerpos monoclonales.

Como se usa en el presente documento, el término "Bo" quiere decir una selección de absorbancia para un ensayo de desplazamiento de la unión y es aproximadamente del 30 % al 50 % de la Umáx para el ensayo de desplazamiento. Como tal, la Bo se puede usar para medir rápidamente la tasa de disociación, que se puede usar para evaluar la avidéz. Asimismo, se puede usar el 50 % de la Umáx cuando la DO es aproximadamente la mitad de la Umáx, que generalmente puede variar de 1,7 a 1 DO. A veces, el 50 % de la Umáx puede tener una DO que es tan elevada como de 1,7, que puede estar demasiado saturada con anticuerpo como para realizar mediciones precisas y a menudo conduce a un desplazamiento escaso. Por tanto, el 30 % de la Umáx se puede usar en el caso en el que el anticuerpo todavía esté demasiado saturado. Con el fin de producir valores de Bo y datos de desplazamiento adecuados, la Umáx puede estar dentro de 2,0 y 2,5 DO y la Bo puede estar dentro de 1,0 y 1,25 DO.

Como se usa en el presente documento, los términos "inmunoensayo" o "inmunodiagnóstico" quieren decir técnicas de laboratorio que hacen uso de la unión entre un antígeno y un anticuerpo con el fin de identificar y/o cuantificar al menos uno del antígeno específico o anticuerpo específico en una muestra biológica. En la actualidad hay tres clases de inmunoensayo, que se describen del siguiente modo: (1) ensayos de captura de anticuerpos; (2) ensayos de captura de antígeno y (3) ensayos de tipo "sándwich" de dos anticuerpos. Adicionalmente, se contempla que se desarrollarán nuevos inmunoensayos y serán capaces de usar los análogos y los anticuerpos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inmunoensayo competitivo" quiere decir un protocolo experimental en el que una cantidad conocida de un antígeno identificable compite con otro antígeno por la unión con un anticuerpo. Es decir, un antígeno conocido que se une a un anticuerpo conocido se combina con una muestra que se sospecha que contiene otro antígeno que también se une al anticuerpo conocido. Esto permite que el antígeno conocido y otro antígeno compitan ambos por el sitio de unión sobre el anticuerpo. Por ejemplo, un análogo de topiramato que se une a un anticuerpo anti-topiramato se puede combinar con una muestra que se sospecha que contiene topiramato y el análogo y el topiramato compiten por la unión con el anticuerpo anti-topiramato. La competición por la unión al anticuerpo se puede usar después para determinar si hay o no topiramato presente en la muestra y se puede usar además para cuantificar la cantidad de topiramato en la muestra.

Como se usa en el presente documento, la expresión "detección turbidimétrica" hace referencia a la medición de una disminución en la intensidad de la transmisión o un incremento de la absorbancia o luz incidente debido a la luz dispersada por las partículas aglutinadas. Una disminución de la intensidad de la luz transmitida se mide contra una intensidad de fondo de partida de la luz transmitida más alta. Normalmente, la lectura se realiza con un detector en línea con la fuente de luz, en el que la aglutinación de partículas inhibe la transmisión de la luz. Por tanto, la inhibición o la estimulación de la aglutinación se pueden usar como medio para evaluar la presencia de un analito diana, tal como topiramato. Los ensayos turbidimétricos se pueden adaptar fácilmente a diversos analizadores clínicos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ensayos de aglutinación de micropartículas" quiere decir inmunoensayos que usan el principio de la inhibición de la aglutinación de micropartículas por un analito diana. Es decir, la disminución de la aglutinación se atribuye a la presencia del analito diana. Por ejemplo, un derivado del



fármaco diana se une covalentemente a la superficie de la micropartícula y/o las partículas sensibilizadas son aglutinadas por un anticuerpo monoclonal. Cuando una muestra contiene fármaco libre, la aglutinación es inhibida en proporción a la concentración del fármaco, lo que conduce a una curva de inhibición clásica que relaciona la concentración del fármaco con la absorbancia.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "concentración terapéutica" quiere decir la concentración de un fármaco que es eficaz en la producción de un efecto clínico deseado.

10 Como se usa en el presente documento, "grupo operativo" quiere decir una molécula o macromolécula acoplada al topiramato a través de un grupo de unión. Un grupo operativo puede incluir un resto inmunogénico, un resto antigénico, un resto trazador y similares.

15 Como se usa en el presente documento, las expresiones "éster activo" o "éster activado" quieren decir un grupo éster que puede reaccionar con un grupo amino libre de un compuesto tal como, por ejemplo, péptidos y proteínas. Un éster activo puede incluir un grupo carboxilo unido a un grupo saliente activo. A menudo, el grupo saliente activo incluye el oxígeno del éster de modo que el grupo saliente activo elimina el oxígeno del éster. Por ejemplo, un éster activo es susceptible a ser desplazado por una amina primaria, lo que tiene como resultado la eliminación del oxígeno del éster y la formación de un grupo amida. Ejemplos de grupos salientes activos que forman ésteres activos incluyen N-hidroxisuccinimida (en el presente documento denominada "NHS", p-nitrofenilo, pentafluorofenilo, N-hidroxibenzotriazolilo y similares.

20 Como se usa en el presente documento, las expresiones "marcador", "molécula detectora" o "trazador" quieren decir cualquier molécula que produce, o que se puede inducir que produzca, una señal detectable. El marcador se puede conjugar con topiramato, un análogo de topiramato, hapteno, analito, inmunógeno, anticuerpo u otra molécula, tal como un receptor o una molécula que se puede unir a un receptor. Ejemplos no limitantes de trazadores incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fragmentos enzimáticos, sustratos enzimáticos, inhibidores de enzimas, coenzimas, catalizadores, fluoróforos, colorantes, quimioluminiscentes, luminiscentes, sensibilizantes, partículas no magnéticas o magnéticas, soportes sólidos, liposomas, ligandos, receptores, isótopos radiactivos de haptenos y similares. Como se describe en el presente documento, los análogos también se pueden asociar a varios marcadores mediante procedimientos bien conocidos en la técnica para proporcionar diversos reactivos útiles en varios formatos de inmunoensayos. Para detectar los resultados de los inmunoensayos, moléculas detectoras, como fluoróforos, por ejemplo fluoresceína, radiomarcadores o grupos quimioluminiscentes, se pueden acoplar a los análogos para producir trazadores.

35 Como se usa en el presente documento, las expresiones "grupo de unión" o "enlazador" quieren decir una estructura química que conecta dos o más subestructuras tales como topiramato o un análogo de topiramato, con un grupo operativo. Un grupo de unión puede tener al menos una cadena ininterrumpida de átomos distintos a hidrógeno (u otros átomos monovalentes) que se extienden entre las subestructuras. Normalmente, un grupo de unión incluye una cadena de átomos de carbono o heteroátomos, que pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los átomos de un grupo de unión y los átomos de una cadena dentro de un grupo de unión pueden estar interconectados por enlaces químicos. Por ejemplo, los enlazadores pueden ser cadenas lineales o ramificadas, sustituidas o no sustituidas, saturadas o insaturadas, en las que los átomos de la cadena pueden incluir átomos de carbono y/o heteroátomos. Esto puede incluir uno o más heteroátomos dentro de la cadena o en los extremos de las cadenas. Adicionalmente, un grupo de unión puede incluir también grupos cíclicos y/o aromáticos como parte de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos en la cadena. El número de átomos en un grupo de unión o enlazador se determina contando los átomos distintos a nitrógeno en la estructura de la cadena, que es la ruta más corta entre las subestructuras que se están conectando. Los grupos de unión se pueden usar para proporcionar un sitio disponible sobre un hapteno para conjugar un hapteno con un grupo operativo tal como un trazador, marcador, vehículo, resto inmunogénico y similares.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "heteroátomos" quiere decir átomos distintos a átomos de carbono tales como oxígeno, nitrógeno, fósforo y similares. Normalmente, un heteroátomo es multivalente para formar al menos dos enlaces covalentes, que se pueden usar en un grupo de unión u otro resto.

55 Los análogos de topiramato pueden incluir una molécula de topiramato conjugada con un resto. El resto puede ser cualquiera de un amplio abanico de compuestos químicos que pueden modificar las propiedades fisicoquímicas del topiramato. Asimismo, el resto se puede usar como un enlazador conjugar un grupo de unión al topiramato. De acuerdo con lo anterior, el resto puede estar comprendido por un alquilo, alifático, alifático de cadena lineal, alifático ramificado, alifático sustituido, alifático cíclico, alifático heterocíclico, aromático, heteroaromático, poliaromático y similares.

60 Como se usa en el presente documento, el término "alifático" quiere decir un resto hidrocarbilo, tal como un grupo alquilo, que puede ser lineal o ramificado, estar saturado o insaturado y/o sustituido o no sustituido, que tiene veinte o menos carbonos en la estructura. Un grupo alifático puede comprender restos que son lineales, ramificados, cíclicos y/o heterocíclicos, y contienen grupos funcionales tales como éteres, cetonas, aldehídos, carboxilatos y similares. Ejemplos de grupos alifáticos incluyen, entre otros, grupos sustituidos y/o no sustituidos de metilo, etilo,

propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, grupos alquilo de un número más alto de carbonos y similares, así como 2-metilpropilo, 2-metil-4-etilbutilo, 2,4-dietilpropilo, 3-propilbutilo, 2,8-dibutildecilo, 6,6-dimetiloctilo, 6-propil-6-butiloctilo, 2-metilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo y similares. Los términos alifático o alquilo también abarcan grupos alqueno tales como grupos vinilo, alilo, aralquilo y alquinilo.

Sustituciones dentro de un grupo alifático pueden incluir cualquier átomo o grupo que se puede tolerar en el resto alifático, incluyendo, entre otros, halógenos, azufres, tioles, tioéteres, tioésteres, aminas (primarias, secundarias o terciarias), amidas, éteres, ésteres, alcoholes, oxígeno y similares. Los grupos alifáticos pueden, a modo de ejemplo, también comprender modificaciones tales como grupos azo, grupos ceto, grupos aldehído, grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos nitro, nitroso o nitrilo, heterociclos tales como grupos imidazol, hidrazino o hidroxilamino, grupos isocianato o cianato, y grupos que contienen azufre tales como sulfóxido, sulfona, sulfuro y disulfuro. Adicionalmente, las sustituciones pueden ser mediante enlaces sencillos, dobles o triples, cuando sea relevante o posible.

Adicionalmente, los grupos alifáticos también pueden contener heterosustituciones, que son sustituciones de átomos de carbono, por heteroátomos, tales como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, fósforo o azufre. Como tales, un enlazador comprendido por un alifático sustituido puede tener una estructura comprendida por carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y/o similares. Sustituciones heterocíclicas hacen referencia a anillos alquilo que tienen uno o más heteroátomos. Ejemplos de restos heterocíclicos incluyen, entre otros, morfolino, imidazol y pirrolidino.

Como se usa en el presente documento, el término "aromático" quiere decir una molécula que es una en la que los electrones son libres de circular alrededor de disposiciones circulares o cíclicas de átomos, que están alternativamente unidos entre sí por enlaces sencillos o dobles. Más adecuadamente, estos enlaces se pueden ver como híbridos de un enlace sencillo y un enlace doble, siendo cada enlace en el anillo idéntico a los otros. Ejemplos de compuestos aromáticos que pueden estar presentes en los análogos de topiramato incluyen benceno, bencilo, tolueno, xileno y similares. El compuesto aromático puede incluir heteroátomos para ser un heteroaromático tal como iridina, furano, tetrahydrofurano y similares. Asimismo, un aromático puede ser un aromático policíclico tal como naftaleno, antraceno, fenantreno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, indol, quinolina, isoquinolina y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "amina" quiere decir restos que pueden derivar directa o indirectamente de amoníaco sustituyendo uno, dos o tres átomos de hidrógeno por otros grupos, tales como, por ejemplo, grupos alquilo. Las aminas primarias tienen las estructuras generales  $RNH_2$  y las aminas secundarias tienen la estructura general  $R_2NH$ . El término amina incluye, entre otras, metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, anilina, ciclohexilamina, bencilamina, aminas policíclicas, aril y alquilaminas sustituidas con heteroátomo, dimetilamina, dietilamina, diisopropilamina, dibutilamina, metilpropilamina, metilhexilamina, metilciclopropilamina, etilciclohexilamina, metilbencilamina, metilciclohexilmetilamina, butilciclohexilamina, morfolina, tiomorfolina, pirrolidina, piperidina, 2,6-dimetilpiperidina, piperazina y alquil o arilaminas secundarias sustituidas con heteroátomo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "poli(aminoácido)" o "polipéptido" es una poliamida formada por aminoácidos. Los poli(aminoácidos) generalmente variarán de aproximadamente 200-2.000 de peso molecular o más de aproximadamente 2.000 de peso molecular, o que no tienen un límite superior del peso molecular y siendo normalmente inferior a 10.000.000 y normalmente superior a aproximadamente 600.000 daltons. Normalmente habrá intervalos diferentes, en función de si está implicado un vehículo inmunogénico o una enzima.

Como se usa en el presente documento, el término "péptido" quiere decir cualquier compuesto formado por la unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces amida (péptido), normalmente un polímero de  $\alpha$ -aminoácidos en los que el grupo  $\alpha$ -amino de cada residuo de aminoácido (a excepción del extremo  $NH_2$ ) está unido al grupo  $\alpha$ -carboxilo del siguiente residuo en una cadena lineal. Los términos "péptido", "polipéptido" y "poli(aminoácido)" se usan de forma sinónima en el presente documento para hacer referencia a esta clase de compuestos sin restricciones en cuanto al tamaño. Los miembros más grandes de esta clase se denominan proteínas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra biológica" quiere decir una muestra sólida o líquida que se obtiene a partir de una entidad biológica. Como tal, una muestra biológica puede incluir, entre otros, cualquier cantidad de una sustancia de algo vivo o algo antes vivo, tal como seres humanos y otros animales. Dicha sustancia puede incluir, entre otros, sangre, suero, plasma, orina, lágrimas, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, linfa, ganglios linfáticos, tejido sinovial, condrocitos, macrófagos sinoviales, células endoteliales piel y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" quiere decir ser humano y otros sujetos animales. Más particularmente, un paciente es un ser humano u otro sujeto animal que necesita un fármaco epiléptico tal como topiramato.

Adicionalmente, los términos usados en el presente documento para describir la invención se pueden interpretar usando las definiciones anteriores y/o definiciones bien conocidas en la técnica. Como tal, con la terminología

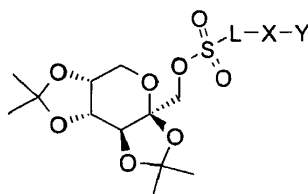
anterior se pretende describir la invención y no se pretende que sea limitante.

### **I. Análogos de topiramato**

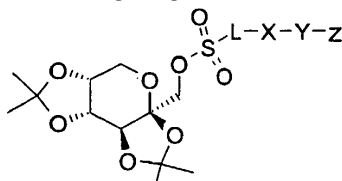
5 En una realización, la presente invención se refiere a análogos de topiramato. Como tal, el topiramato se puede conjugar con un resto análogo en el resto sulfamato o el grupo metilo en el carbono 9 o el carbono 10 de topiramato para formar un análogo. Las conjugaciones de 9 carbonos o 10 carbonos son sustancialmente similares en química y/o funcionalidad de modo que son sustancialmente indistinguibles en muchas aplicaciones, en las que la referencia al carbono 9 o a la posición 9 quiere decir que también se hace referencia al carbono 10 o la posición 10.

10 Un análogo de topiramato puede además acoplarse a través el resto de análogo o enlazador a un resto inmunogénico, resto antigénico y/o resto trazador, que forma otro análogo tal como un inmunógeno, antígeno y/o trazador. Adicionalmente, la conjugación a través del resto de sulfamato en lugar del grupo metilo en el carbono 9 puede ser ventajosa en determinados casos, porque la porción del análogo de topiramato disponible para la inducción y reconocimiento de anticuerpos es la región que difiere en el metabolito de topiramato 9-hidroxitopiramato.

20 En una realización, la presente invención describe nuevos análogos de topiramato que tienen conjugaciones de sulfamato. Es decir, el grupo sulfamato se puede acoplar a un resto de unión a través del átomo de azufre. El resto enlazador se puede considerar que es el sustituyente que está acoplado con el armazón de topiramato con el fin de formar el análogo. El resto enlazador puede ser cualquiera de una amplia gama de entidades químicas, que se describen con mayor detalle a continuación. De acuerdo con lo anterior, el análogo de topiramato sustituido con sulfamato puede tener la estructura genérica de la Fórmula 1A y/o de la Fórmula 1B:

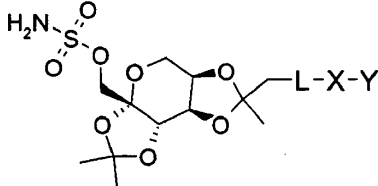


FÓRMULA 1A

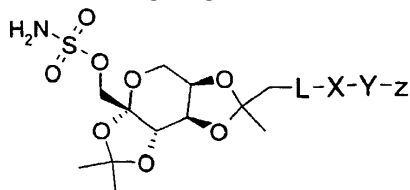


FÓRMULA 1B

30 En otra realización, el armazón de topiramato puede incluir una sustitución en 9, que es sustancialmente similar a la sustitución en 10. De acuerdo con lo anterior, el análogo de topiramato sustituido en 9 puede tener la estructura genérica de la Fórmula 2A y/o de la Fórmula 2B:



FÓRMULA 2A



FÓRMULA 2B

35 El armazón de topiramato representado en las Fórmulas 1A, 1B, 2A y/o 2B pueden estar sustituidos con una amplia gama de entidades químicas. De acuerdo con lo anterior, el grupo L puede ser O, CO, COO, SO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>, NH, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH, NHCO, o NHCH<sub>2</sub>Ph. Como tal, el grupo L puede usarse como un grupo de unión para conjugar el

40

resto análogo y/o conjugar el resto con el armazón de topiramato.

Adicionalmente, como se usa en relación con las Fórmulas 1A, 1B, 2A y/o 2D, el grupo X puede ser saturado o insaturado, sustituido o no sustituido y/o de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de carbono o heteroátomos o, más preferentemente, 0-10 átomos de carbono o heteroátomos. Algunos ejemplos de grupos de sustitución incluyen aminas primarias y secundarias, alifáticos, grupos carbonilo, halógenos y similares. Asimismo, el grupo X puede incluir un grupo cíclico que está sustituido o no sustituido o un grupo aromático o alifático sustituido o no sustituido que tiene 1-2 anillos, anillos aromáticos policíclicos, anillos heteroaromáticos y similares. El grupo X también puede ser un grupo de unión alifático sustituido o no sustituido que contiene 1-20 o 1-10 átomos de carbono en la cadena o heteroátomos el lugar de o además de un grupo anillo. Adicionalmente, el grupo X puede ser cualquier tipo de enlace entre L e Y. Asimismo, X puede ser cualquier combinación de los grupos anteriores.

El grupo Y puede ser un grupo terminal o un grupo de acoplamiento que se puede usar para acoplar el grupo enlazador con un grupo operativo, tal como un vehículo, marcador, resto inmunogénico y similares. En algunos casos, el grupo terminal puede derivar o acoplarse a un vehículo, resto trazador o resto inmunogénico mediante síntesis químicas bien conocidas en la técnica, en el que el grupo Y puede ser un grupo reactivo que se usa para acoplarse con el grupo Z. Como tal, Y puede ser varios grupos, tales como alifáticos, alcoholes, aminas, amidas, ácidos carboxílicos, aldehídos, ésteres, ésteres activados, ésteres alifáticos, imidoésteres, isocianatos, isotiocianatos, anhídridos, tioles, alcoholes tiolactonas, grupos diazonio, grupos maleimido y similares, así como grupos derivados de los mismos. Asimismo, Y puede ser un grupo Y<sub>1</sub>-Z, en el que Y<sub>1</sub> sería del grupo terminal Y que está acoplado al grupo Z.

Adicionalmente, el grupo Z puede ser nada o cualquier resto que se puede acoplar al resto enlazador. Como tal, el grupo L—X—Y puede considerarse el resto análogo y el grupo Z puede ser un grupo operativo. El resto enlazador puede servir funcionalmente como un enlazador o grupo de unión entre el armazón de topiramato y un grupo operativo. Por ejemplo, el grupo operativo puede ser un vehículo, marcador, trazador, proteína, enzima, compuesto fluorescente, compuesto fosforescente, compuesto termocrómico, compuesto fotocromático, compuesto de regulación por aumento anti-stokes, material quimioluminiscente, mediador electroquímico, partícula, grupo indicador, inhibidor enzimático, ácido nucleico, polipéptido y similares.

Por ejemplo, en cada una de las Fórmulas 1A, 1B, 2A y/o 2B, el grupo X puede ser un enlace o una cadena de uno o más átomos, en el que al menos un átomo es carbono, si está presente. Como tal, X puede ser un enlace covalente entre L e Y. De forma ilustrativa, X puede ser cualquiera de los grupos anteriores: CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>; (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>; CH<sub>2</sub>CO; (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO; (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO; (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO; (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO; (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CO; CH<sub>2</sub>COO; (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COO; (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO; (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO; (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COO; (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>COO; CO; COO; COCH<sub>2</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>; COCH<sub>2</sub>CO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CO; COCH<sub>2</sub>COO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>COO; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>; CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; Ph; CONHCH<sub>2</sub>Ph; CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO; CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO; NHCH<sub>2</sub>; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>; NHCH<sub>2</sub>CO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CO; NHCH<sub>2</sub>COO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COO; NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>COO; NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>; NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO; HCO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CO; NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COO; o NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>COO; combinaciones de los mismos; y similares. Más preferentemente, X se puede seleccionar del grupo que consiste en CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>COO, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COO, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CO, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>COO, CO, COO, Ph, CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO, CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO, combinaciones de los mismos, y similares.

Por ejemplo, en cada una de las Fórmulas 1 y 2, el grupo Y puede comprender un grupo terminal o enlazador derivado del grupo terminal y siempre está presente. De forma ilustrativa, Y puede ser cualquiera de los siguientes grupos terminales o un grupo enlazador derivado de los mismos: COOH (ácido carboxílico); COO; COO-NHS (éster activo NHS); NHS; terc-butilo (t-butilo); COO-terc-butilo; OH; O-NHS (enlazador de éster activo NHS); COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; COOCH<sub>3</sub>; OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; OCH<sub>3</sub>; NH; NH<sub>2</sub>; NHCO (amida); combinaciones de los mismos; y similares. Más preferentemente, cuando Y es un grupo terminal, se puede seleccionar del grupo que consiste en NHS, COOH, COO-NHS, COO-terc-butilo, terc-butilo, OH, O-NHS, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, COOCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, o NH<sub>2</sub>. Por otro lado, cuando Y es un enlazador, es Y<sub>1</sub>-Z, en el que Y<sub>1</sub> puede seleccionarse, preferentemente, del grupo que consiste en es al menos uno de COO, CO, O, CONH, o NH y Z es una macromolécula.

De acuerdo con lo anterior, el grupo Z o grupo operativo puede ser un vehículo, trazador o indicador, tal como proteína, enzima, compuesto fluorescente, material quimioluminiscente, mediador electroquímico, partícula, grupo indicador, inhibidor enzimático y/o ácido nucleico. De forma ilustrativa, Z puede ser cualquiera de los siguientes grupos de macromoléculas: (a) BSA, (b) KLH, (c) trazador fluorescente y (d) similares.

Generalmente, los análogos pueden incluir diversos grupos operativos mediante procedimientos bien conocidos en la técnica para proporcionar diversos reactivos útiles en varios formatos de inmunoensayo. Como tal, las moléculas detectoras, tales como fluoróforos, grupos radiomarcados o quimioluminiscentes, se pueden usar para producir trazadores. Los análogos también se pueden unir a micropartículas, tales como látex coloreado, para usar en formatos de detección óptica directa o espectrofotométrica tal como en aglutinación de látex y pruebas de tiras cromatográficas. El grupo operativo también puede ser una molécula de detección indirecta, tal como una pareja de

transferencia de energía, grupo enzimático o de otro tipo, que se detecta mediante reacciones químicas adicionales.

De acuerdo con lo anterior, el acoplamiento de un grupo operativo con el análogo se puede conseguir mediante cualquier reacción química que se acoplará al grupo operativo. Este enlace o acoplamiento puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y formación de complejos. Con mayor frecuencia, el enlace o acoplamiento se realiza a través de unión covalente. La unión covalente se puede conseguir mediante condensación directa de las cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas de puente externas. Muchos agentes de unión bivalentes o polivalentes pueden ser útiles en las moléculas proteicas de acoplamiento, tal como un vehículo, al análogo. Agentes de acoplamiento representativos incluyen compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de N-hidroxisuccinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas; no obstante este listado no es una recopilación exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica sino que, en su lugar, es representativa de los agentes de acoplamiento más frecuentes.

- 15 En una realización el análogo de lamotragina puede tener L-X-Y seleccionados del grupo que consiste en
- |   |  |   |   |               |
|---|--|---|---|---------------|
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOOH,   | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOONHS,  |   |   |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ,                                      | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH,                                |   |   |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COONHS,                                 | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , |   |   |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH,                                   | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COONHS,                              |   |   |               |
| 20 NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH,                                |   |   |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COONHS,                                 | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , |   |   |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> PhCOOH,   | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> PhCOONHS,  |   |   |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> PhCOOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ,                    | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH,                              |   |   |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COONHS,                               | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>3</sub> ,               |   |   |               |
| 25 NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONHCH <sub>2</sub> PhCOOH,  | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONHCH <sub>2</sub> PhCOOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ,   | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH,                                     |   |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COONHS,   | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ,   | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH,                                     | NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COONHS, |               |
| NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ,  | NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH,  | NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COONHS, |   |               |
| NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ,  | NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ,  | NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH,     |   |               |
| NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COONHS,   | NHCH <sub>2</sub> PhCOOH,  | NHCH <sub>2</sub> PhCOONHS,   | NHCOPhCOOH,                                 | NHCOPhCOONHS, |
| 30 OOCNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ,  | OOCNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>3</sub> ,  | OOCNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COONHS,                                  | OOCNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH,  |               |
| NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH,   | NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COONHS,  | y similares.  |   |               |

En una realización, realización el análogo de lamotragina puede tener L-X-Y seleccionados del grupo que consiste en

NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOO-BSA,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO-BSA,			
35 NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-BSA,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COO-BSA,			
NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> PhCOO-BSA,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-BSA,			
NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONHCH <sub>2</sub> PhCOO-BSA,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO-BSA,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-BSA,	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COO-BSA,	
40 BSA,	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-BSA,	NHCH <sub>2</sub> PhCOO-BSA,	NHCOPhCOO-BSA,	OOCNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-BSA,
NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-BSA,	y similares.			

En una realización, los análogos de topiramato de las Fórmulas 1A, 1B, 2A y/o 2B se pueden usar como agentes terapéuticos. Como tales, los análogos de topiramato se pueden usar como fármacos antiepilépticos de forma similar al topiramato. No obstante, cuando se usa un análogo de topiramato como agente terapéutico, Z es, preferentemente, nada para no formar un inmunógeno. Por tanto, los análogos no inmunogénicos de topiramato se pueden usar en regímenes antiepilépticos para animales, incluidos los seres humanos.

## II. Inmunógenos de topiramato

La implementación de un inmunoensayo para la detección de una molécula pequeña, tal como topiramato, puede ser un reto. Esto es porque dichas moléculas pequeñas a menudo pueden carecer de antigenicidad, lo que dificulta la generación de anticuerpos contra topiramato y es particularmente problemático con el topiramato, que carece de inmunogenicidad. Para aumentar la inmunogenicidad, compuestos antigénicos más grandes, incluidos, entre otros, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana y similares, se pueden acoplar al fármaco. Adicionalmente, la detección del fármaco en un inmunoensayo generalmente requiere el uso de un trazador detectable conjugado con un anticuerpo, topiramato o análogo de topiramato.

De acuerdo con lo anterior, el acoplamiento de un grupo operativo al topiramato en el resto de sulfamato o el grupo metilo en el carbono 9 puede proporcionar un inmunógeno de topiramato que es suficientemente inmunológicamente similar al topiramato de modo que los anticuerpos inducidos por el inmunógeno pueden reaccionar con el Inmunógeno, topiramato, y otros análogos de topiramato. Como tal, un inmunógeno basado en topiramato también se considera un análogo de topiramato. Los análogos de topiramato de acuerdo con la presente invención que incluyen un vehículo inmunogénico pueden ser capaces de inducir la producción de anticuerpos anti-topiramato, tal como anticuerpos monoclonales y policlonales. De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos generados usando inmunógenos de topiramato únicos pueden interactuar y/o unirse a topiramato y otros análogos de topiramato. Estos anticuerpos, inmunógenos, antígenos y análogos pueden ser útiles en la preparación y realización de inmunoensayos para la detección de topiramato en muestras biológicas.

Los inmunógenos se pueden fabricar acoplando topiramato a una proteína vehículo antigénico a través de un enlazador que ha reaccionado con uno de los grupos funcionales de un derivado de topiramato. Un inmunógeno de topiramato que se basa en un análogo de topiramato se describió en la patente de EE.UU. N° 5.952.187. No obstante, los análogos de topiramato se prepararon con química no optimizada y no produjeron análogos, inmunógenos o anticuerpos óptimos para usar en aplicaciones de detección de topiramato comercializadas. Por tanto, los análogos e inmunógenos preparados de acuerdo con la presente invención tienen una química y enlazadores mejorados y tienen como resultado inmunógenos que pueden producir anticuerpos y títulos suficientes para usar en aplicaciones comerciales.

En una realización, con el fin de aumentar la inmunogenicidad de un análogo de topiramato, un compuesto antigénico grande, tal como la hemocianina de lapa californiana, se puede acoplar a un análogo de topiramato. Asimismo, se ha descubierto que, en algunos casos, enlazadores más largos pueden incrementar la afinidad de los anticuerpos producidos. En parte, se piensa que, sin desear quedar unido al mismo, los enlazadores más largos pueden permitir más accesibilidad al antígeno. Asimismo, debido a la mayor área de superficie del antígeno o epítipo expuestos, la avidéz también se puede aumentar, lo que puede proporcionar una mejora en la técnica.

En una realización, la presente invención se refiere a inmunógenos preparados a partir de los análogos de topiramato anteriores, Es decir, los análogos de las Fórmulas 1B y 2B pueden incluir los restos enlazadores como se ha descrito anteriormente y Z puede ser un inmunógeno. Como tal, Z puede ser un resto inmunogénico que puede producir una respuesta inmunológica y proporciona anticuerpos para su producción dirigidos a al menos una porción del análogo de topiramato.

Un resto inmunogénico puede incluir varias proteínas o polipéptidos, que pueden funcionar como vehículo inmunogénico. Estos tipos de polipéptidos incluyen albúminas, proteínas en suero, globulinas, proteínas del cristalino ocular, lipoproteínas y porciones de los mismos. Proteínas ilustrativas incluyen seroalbúmina bovina ("BSA"), hemocianina de lapa californiana ("KLH"), ovoalbúmina de huevo, gamma-globulina bovina ("BGG") y similares. Como alternativa se pueden usar polipéptidos sintéticos. Adicionalmente, un resto inmunogénico también puede ser un polisacárido, que es un polímero de alto peso molecular. Ejemplos de polisacáridos son almidones, glicógeno, celulosa, gomas de hidrato de carbono tal como goma arábica, agar y similares. Asimismo, un resto inmunogénico puede ser un polinucleótido tal como ADN o ARN. El polinucleótido puede estar modificado o no modificado y compuesto por cualquier número de ácidos nucleicos siempre que proporcione la funcionalidad de vehículo y/o inmunogénica. El polisacárido también puede contener o unirse a un residuo polipeptídico, residuo polinucleotídico y/o residuos lipídicos. Adicionalmente, un resto inmunogénico también puede ser un polinucleótido, solo o conjugado con uno de los polipéptidos o polisacáridos mencionados anteriormente.

Un resto inmunogénico o vehículo también puede ser una partícula o micropartícula. Las partículas inmunogénicas tienen, generalmente, un diámetro de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) y de no más de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  y normalmente de aproximadamente 0,05  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ . La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable y/o porosa o no porosa. Opcionalmente, una partícula inmunogénica puede tener una densidad de aproximadamente la del agua, generalmente de aproximadamente 0,5 a 1,5 g/ml y puede estar compuesta por un material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas inmunogénicas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, incluyendo ejemplos no limitantes tales como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, y partículas víricas. Las partículas también pueden estar compuestas por polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, látex, vesículas de fosfolípidos, liposomas, liposomas catiónicos, liposomas aniónicos, lipoproteínas, lipopolímeros y similares.

En una realización, realización el análogo de lamotragina puede tener L-X-Y seleccionados del grupo que consiste en

NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOO-KLH,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO-KLH,
NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-KLH,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COO-KLH,
NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> PhCOO-KLH,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-KLH,
NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONHCH <sub>2</sub> PhCOO-KLH,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO-KLH,
NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO-KLH,	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-KLH,
NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-KLH,	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COO-KLH,
NHCH <sub>2</sub> PhCOO-KLH,	NHCOPhCOO-KLH,
NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-KLH, y similares.	OOCNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO-KLH,

Por tanto, los inmunógenos preparados de acuerdo con la presente invención se pueden usar para generar anticuerpos que pueden tener una afinidad por topiramato, así como análogos de topiramato.

### III. Anticuerpos para topiramato y análogos de topiramato

En una realización, un inmunógeno basado en un análogo de topiramato de acuerdo con la presente invención se puede usar en una realización de un procedimiento para producir anticuerpos monoclonales y/o policlonales. Como tales, los anticuerpos se pueden producir a partir del inmunógeno a base de topiramato e interaccionan y/o se unen al topiramato. Esto puede permitir que los análogos de la presente invención sean útiles en la preparación de anticuerpos para usar en inmunoensayos para identificar la presencia de topiramato. Asimismo, los procedimientos de producción de anticuerpos con inmunógenos son bien conocidos en la técnica. Los inmunógenos se pueden usar

en la detección selectiva de anticuerpos monoclonales y/o policlonales que interaccionan y/o se unen a topiramato.

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento 10 para obtener anticuerpos anti-topiramato, se puede obtener un inmunógeno basado en un análogo de topiramato (Bloque 2). A continuación, el inmunógeno se puede combinar con una formulación inmunogénica (Bloque 14). En pocas palabras, aproximadamente 0,5 ml de una composición inmunogénica se mezcla con aproximadamente 0,5 ml de adyuvante de Freund; no obstante, se pueden usar otras cantidades de inmunógeno y/o adyuvante. Después, la formulación inmunogénica se puede administrar a un sujeto productor de anticuerpos (Bloque 16), que puede ser una rata, ratón, cerdo, conejo, ave, oveja y/u otro animal, pero, preferentemente, mamíferos. La administración puede ser a través de una inyección en la vena de la cola, inyección subcutánea, inyección intravenosa u otros sitios de inyección bien conocidos. Posteriormente se pueden administrar refuerzos inmunogénicos al animal que recibió la administración inicial (Bloque 18), en la que el refuerzo puede incluir sustancialmente los mismos ingredientes que la formulación inicial y se puede administrar a intervalos predeterminados. Por ejemplo, a la administración inicial le puede seguir refuerzos adicionales una vez a la semana o a otros intervalos más largos o más cortos. Después de al menos la administración inicial y opcionalmente tras refuerzos adicionales, se pueden recoger los anticuerpos anti-topiramato producidos por el animal (Bloque 20). Los anticuerpos se pueden recoger mediante la obtención de sangre, suero, plasma u otra muestra biológica del animal al que previamente se ha administrado el inmunógeno. Opcionalmente, la composición que contienen el anticuerpo se puede procesar como se sabe bien en la técnica (Bloque 22), en la que dicho procesamiento puede incluir técnicas que colocan los anticuerpos en un formato adecuado para realizar un ensayo inmunodiagnóstico. Como alternativa, el procesamiento puede incluir la detección selectiva de los anticuerpos con ELISA mediante técnicas bien conocidas y establecidas. Como tal, el procesamiento se puede usar para obtener anticuerpos policlonales (Bloque 24), que también puede tener como resultado la purificación de anticuerpos policlonales (Bloque 26). Como alternativa se pueden usar técnicas bien conocidas en la materia para obtener anticuerpos monoclonales que también pueden tener como resultado la purificación de anticuerpos monoclonales.

#### **IV. Ensayos inmunodiagnósticos**

Los anticuerpos anti-topiramato, sean monoclonales o policlonales, se pueden usar en inmunoensayos para identificar la presencia de topiramato en una muestra, tal como sangre, plasma, suero, tejido, y similares. Esto puede ser beneficioso para la identificación o determinación de parámetros farmacocinéticos y / o farmacodinámicos para topiramato en un paciente o población de pacientes. Por lo tanto, los anticuerpos anti-topiramato se pueden utilizar en ensayos inmunodiagnósticos en lugar de otros anticuerpos de manera que los ensayos se pueden configurar para identificar la presencia y, opcionalmente, cuantificar la cantidad de topiramato. Además, los ensayos inmunodiagnósticos pueden utilizar análogos de topiramato de acuerdo con la presente invención u otros análogos de topiramato.

##### **A. Inmunoensayo de polarización de fluorescencia para topiramato**

La tecnología de inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) se basa en la unión competitiva entre un antígeno / fármaco en una muestra y una concentración conocida de antígeno / fármaco marcado. La tecnología FPIA se describe en las patentes de EE.UU. N° 4.593.089, 4.492.762, 4.668.640, y 4.751.190. Por consiguiente, los reactivos, sistemas y equipos de FPIA descritos en las referencias incorporadas se pueden utilizar con anticuerpos anti-topiramato que también son anticuerpos anti-análogos de topiramato.

La tecnología FPIA se puede utilizar para identificar la presencia de topiramato y se puede utilizar en los ensayos que cuantifican la cantidad de topiramato en una muestra. En parte, las propiedades rotacionales de moléculas en solución permiten que el grado de polarización sea directamente proporcional al tamaño de la molécula. En consecuencia, la polarización se incrementa a medida que aumenta el tamaño molecular. Es decir, cuando se utiliza luz polarizada linealmente para excitar un topiramato o análogo del mismo marcado fluorescente u otro marcado luminiscente, que es pequeño y gira rápidamente en solución, la luz emitida se despolariza significativamente. Cuando el topiramato o análogo marcado fluorescente interacciona con, o se une a, un anticuerpo, la rotación se ralentiza y la luz emitida es altamente polarizada. Esto es porque el anticuerpo aumenta significativamente y mensurablemente el tamaño del complejo. Además, el aumento de la cantidad de topiramato no marcado en la muestra puede dar lugar a la disminución de la unión del topiramato o análogo marcado fluorescente por el anticuerpo anti-topiramato, y de ese modo, disminuye la polarización de la luz emitida desde la muestra. La relación cuantitativa entre polarización y concentración del topiramato no marcado en la muestra se puede establecer mediante la medición de los valores de polarización de calibraciones con concentraciones conocidas de topiramato. Por lo tanto, se puede usar la tecnología FPIA para identificar la presencia y la concentración de topiramato en una muestra.

Una realización de la presente invención es un sistema de ensayo FPIA. Un ejemplo de componentes del sistema de FPIA puede incluir lo siguiente: i) anticuerpos monoclonales o policlonales anti-topiramato capaces de unirse específicamente a topiramato y a un análogo de topiramato; ii) una muestra sospechosa de contener topiramato; y iii) análogo de topiramato marcado con un resto fluorescente, tal como fluoresceína. Como alternativa, el sistema se puede proporcionar como un kit exclusivo de la muestra. Adicionalmente, el sistema puede incluir diversas

composiciones tampón, composiciones gradiente de concentración de topiramato o una composición madre de topiramato, y similares.

5 La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento 110 para realizar un ensayo FPIA. Como tal, puede obtenerse topiramato marcado luminiscentes o un análogo conjugado puede obtenerse (Bloque 112), y se puede obtener un anticuerpo anti-topiramato (Bloque 114). Adicionalmente se puede obtener una muestra, tal como una muestra biológica de un paciente al que se le está administrando, sospechosa de contener topiramato (Bloque 116). Se pueden obtener cantidades o concentraciones conocidas de conjugado de topiramato marcado luminiscente y anticuerpo y formular en composiciones separadas, tales como en un sistema tampón  
10 estándar, para uso en un ensayo de unión competitiva (Bloque 118). El anticuerpo anti-topiramato el conjugado de topiramato marcado luminiscente se combinan entonces con la muestra biológica en una solución de reacción (Bloque 120). Se produce una reacción competitiva entre el conjugado de topiramato marcado luminiscente y la cantidad desconocida de topiramato en la muestra biológica con el anticuerpo anti-topiramato en la solución de reacción (Bloque 122). Después de una duración y / o competencia adecuadas, se ilumina el conjugado luminiscente  
15 (Bloque 124), que puede ser mediante fotoiluminación, iluminación química, iluminación por temperatura, y similares. La polarización de la luz emitida por la iluminación se mide después (bloque 126) y se compara con los valores de polarización de cantidades conocidas de topiramato y / o el conjugado luminiscente (Bloque 128), que se pueden usar para determinar si hay o no topiramato presente en el muestra (bloque 130). Adicionalmente, la comparación de las mediciones obtenidas a partir de la muestra biológica con mediciones estandarizadas obtenidas a partir de patrones de concentración conocidos se puede utilizar para cuantificar la cantidad de topiramato en la muestra  
20 (Bloque 132) y, de este modo, identificar la cantidad de topiramato en el paciente (Bloque 134).

#### B. Inmunoensayo de micropartículas homogéneas para topiramato

25 La tecnología de inmunoensayo con micropartículas homogéneas ("HMI") que se puede denominar ensayos inmunoturbidimétricos, se basa en la aglutinación de las partículas y los compuestos en solución. Cuando las partículas y / o compuestos químicos se aglutinan, los tamaños de partícula pueden aumentar y aumentar la turbidez de una solución. Por consiguiente, los anticuerpos anti-topiramato se pueden utilizar con micropartículas y análogos de topiramato con el fin de evaluar la presencia, y opcionalmente la cantidad, del topiramato en una muestra. Las tecnologías HMI pueden ser ventajosas debido a que los inmunoensayos pueden realizarse en sangre, hemolizado  
30 de sangre, suero, plasma, tejido, y / u otras muestras. Los ensayos HMI se pueden configurar para realizarse con topiramato y / o un análogo cargado sobre una micropartícula, o con un anticuerpo anti-topiramato cargaron sobre una micropartícula El uso de una micropartícula cargada con análogo puede ser especialmente ventajoso debido a la capacidad de cargar de manera eficiente la micropartícula. En cualquier caso, los ensayos HMI o inmunoturbidimétricos son bien conocidos en la técnica para la medición de la aglutinación de sustancias en una muestra.

Las tecnologías de ensayos inmunoturbidimétricos se describen en las patentes de EE.UU. N° 5.571.728, 4.847.209, 6.514.770, y 6.248.597. En pocas palabras, en los procedimientos de ensayo homogéneos se hace el uso  
40 predominantemente de atenuación de la luz, nefelometría o procedimientos turbidimétricos La formación de un compuesto AB aglutinado a partir de topiramato (A) y la pareja de unión a la micropartícula de anticuerpo anti-topiramato (B) se puede medir mediante el cambio que se produce en la dispersión o absorción de la luz incidente dirigida a la muestra. Como alternativa, el anticuerpo anti-topiramato (A) se puede unir con una micropartícula cargada con topiramato o un análogo. Cuando se utilizan partículas suspendibles que tienen una pareja de unión  
45 inmovilizada, se produce una potenciación de los efectos que hace posible determinar concentraciones de topiramato considerablemente más bajas. Estos procedimientos homogéneos pueden llevarse a cabo de forma rápida y sencilla, y permiten, en particular, la automatización de los análisis de las muestras como se describe con más detalle más adelante.

50 Por ejemplo, en aplicaciones de detección selectiva de alto volumen puede ser deseable disponer de procedimientos de análisis totalmente automatizados. Como tales, se diseñar instrumentos para detectar cambios en la dispersión de la luz por las partículas, tales como partículas de látex sensibilizadas, como resultado de la reacción específica con el analito. Los ensayos que utilizan estos instrumentos pueden hacerse altamente sensible debido a la gran área de superficie de suspensiones de partículas de látex ya los principios físicos de la dispersión de la luz. El principio  
55 fundamental de la detección implica el cambio de dispersión de luz cuando dos o más partículas entran en contacto cercano durante la aglutinación. Cuando un haz de luz pasa a través de una celda de reacción que contiene partículas no aglutinadas, puede haber un cierto grado de dispersión de la luz debida a la refracción, reflexión, absorción y difracción por las partículas. En consecuencia, este principio puede ser beneficioso para la medición de la capacidad de un analito diana, tal como topiramato, para inhibir la aglutinación de partículas. Durante las primeras  
60 etapas de la unión anticuerpo / antígeno de unión comienzan a formarse complejos, en los que estos complejos pueden alterar sustancialmente la distribución angular de la intensidad de la luz dispersada, porque los complejos actúan como partículas más grandes. El cambio de dispersión de la luz como resultado de las partículas más grandes por aglutinación se puede medir mediante detección turbidimétrica y otros métodos, como se describe con más detalle más adelante. Reactivos QMS® de topiramato de Seradyn permiten la automatización completa y son  
65 aplicables a muchos analizadores de química clínica.



La Figura 3 es una ilustración de un ensayo de competición que combina un tampón de anticuerpo con una muestra biológica que tiene fármaco libre, tal como topiramato, y un reactivo de partículas recubiertas con hapteno, en el que el hapteno puede ser un análogo de topiramato. En el ejemplo, la muestra biológica contiene poco o nada de topiramato, no hay inhibición de la aglutinación. A medida que la cantidad de topiramato en la muestra aumenta, puede haber una inhibición parcial con el fin de dar lugar a sólo aglutinación parcial. Además, una gran cantidad de topiramato en la muestra puede dar lugar a la inhibición completa de la aglutinación. Por lo tanto, el análisis de la aglutinación se puede utilizar para identificar la presencia de topiramato. Además, el uso de una curva estandarizada de concentraciones de topiramato, como se muestra en la Figura 4, se puede utilizar para identificar la cantidad de topiramato en la muestra basándose en el cambio de absorbancia desde la aglutinación.

#### 1. Micropartículas cargadas con topiramato

La Figura 5 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento 210 para realizar un ensayo HMI. En consecuencia, los análogos de topiramato se pueden obtener (Bloque 212) y cargar en una micropartícula (Bloque 214), tal como cualquiera de las micropartículas fabricadas y / o vendidas por Seradyn, Inc. (Indianápolis, Indiana), que pueden incluir poliestireno, poliestireno modificado con carboxilato, partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, y similares. Se puede obtener una muestra, tal como una muestra biológica de un paciente al que se le está administrando, sospechosa de contener topiramato (Bloque 216). Se obtiene un anticuerpo anti-topiramato, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal, capaz de unirse a topiramato y a análogos de topiramato de acuerdo con la presente invención (bloque 218) y después se formula opcionalmente en un sistema de tampón estándar (Bloque 220). La composición de anticuerpo se combina después con la micropartícula con topiramato y la muestra biológica (Bloque 222), en la que se conocen las cantidades de anticuerpo y del análogo de topiramato unidos a la micropartícula. Se produce una reacción competitiva entre el análogo de topiramato inmovilizado sobre las micropartículas y el topiramato en la muestra biológica para la unión a una cantidad limitada de anticuerpo anti-topiramato en la solución de reacción (Bloque 224). La aglutinación de micropartículas cargadas con topiramato con anticuerpo se inhibe por la presencia de topiramato en la muestra biológica, en la que la inhibición de la aglutinación es directamente proporcional a la concentración de topiramato en la muestra biológica. Esto permite determinar la presencia de topiramato en la muestra mediante ensayos turbidimétricos bien conocidos (Bloque 226). Adicionalmente, la comparación de las mediciones obtenidas a partir de la muestra biológica con mediciones estandarizadas obtenidas a partir de patrones de concentración conocidos se puede utilizar para cuantificar la cantidad de topiramato en la muestra (Bloque 228) y, de este modo, identificar la cantidad de topiramato en el paciente (Bloque 230).

Una realización de la presente invención es un sistema de ensayo HMI de micropartículas cargadas con análogo de topiramato. Un ejemplo de componentes del sistema de HMI puede incluir lo siguiente: i) anticuerpos monoclonales o policlonales anti-topiramato capaces de unirse específicamente a topiramato y a un análogo de topiramato; ii) una muestra sospechosa de contener topiramato; y iii) análogo de topiramato acoplado a una micropartícula, tal como una micropartícula de poliestireno. Como alternativa, el sistema se puede proporcionar como un kit sin la muestra. Adicionalmente, el sistema puede incluir diversas composiciones tampón, composiciones gradiente de concentración de topiramato o una composición madre de topiramato, y similares.

#### ii. Micropartículas cargadas con anticuerpo anti-topiramato

En otra realización, que es similar a la descrita anteriormente con respecto a micropartículas cargadas con topiramato, un anticuerpo anti-topiramato capaz de unirse a topiramato y a un análogo de topiramato se carga en la micropartícula. El análogo de topiramato puede incluir un grupo operativo de elección, por ejemplo, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, dextrano, y similares. Tiene lugar una reacción competitiva entre el análogo de topiramato y el topiramato en la muestra del paciente para la unión al anticuerpo anti-topiramato inmovilizado sobre la micropartícula. Una vez más, la aglutinación de micropartículas se inhibe por la presencia de topiramato en la muestra del paciente.

La Figura 6 es un diagrama de flujo que ilustra otra realización de un procedimiento 310 para realizar un ensayo HMI. Por consiguiente, los anticuerpos anti-topiramato capaces de unirse específicamente a topiramato y a un análogo de topiramato se pueden obtener (bloque 312) y cargar en una micropartícula (Bloque 314). Se puede obtener una muestra, tal como una muestra biológica de un paciente al que se le está administrando, sospechosa de contener topiramato (Bloque 316). Se puede obtener un análogo de topiramato, en el que el análogo puede incluir un grupo operativo adecuado (Bloque 318). Se pueden obtener cantidades o concentraciones conocidas de las micropartículas cargadas con análogo de topiramato y anticuerpo anti-topiramato se formulan después en composiciones separadas, tales como en un sistema tampón estándar, para uso en un ensayo de unión competitiva (Bloque 320). A continuación, la composición de micropartículas-anticuerpo se combina con la composición de análogo de topiramato y la muestra biológica (Bloque 322). Se produce una reacción competitiva entre el análogo de topiramato y el topiramato en la muestra biológica para la unión al anticuerpo anti-topiramato inmovilizado sobre la micropartícula en la solución de reacción (Bloque 324). La aglutinación de las micropartículas cargadas con anticuerpo anti-topiramato con el análogo de topiramato se inhibe por la presencia de topiramato en la muestra biológica, en la que la inhibición de la aglutinación es directamente proporcional a la concentración de topiramato en la muestra biológica. Esto permite determinar la presencia de topiramato en la muestra mediante ensayos

turbidimétricos bien conocidos (Bloque 326). Adicionalmente, la comparación de las mediciones obtenidas a partir de la muestra biológica con mediciones estandarizadas obtenidas a partir de patrones de concentración conocidos se puede utilizar para cuantificar la cantidad de topiramato en la muestra (Bloque 328) y, de este modo, identificar la cantidad de topiramato en el paciente (Bloque 330).

5 Una realización de la presente invención es un sistema de ensayo HMI de micropartículas cargadas con anticuerpo anti-topiramato. Un ejemplo de componentes del sistema de HMI puede incluir lo siguiente: i) micropartículas cargadas con anticuerpos monoclonales o policlonales anti-topiramato capaces de unirse a topiramato y a un análogo de topiramato; ii) una muestra sospechosa de contener topiramato; y iii) análogo de topiramato que  
10 opcionalmente puede incluir un grupo operativo. Como alternativa, el sistema de ensayo se puede proporcionar como un kit exclusivo de la muestra. Adicionalmente, el sistema de ensayo puede incluir diversas composiciones tampón, composiciones gradiente de concentración de topiramato o una composición madre de topiramato o análogo, y similares.

### 15 C. Inmunoensayos con donantes de enzimas clonadas para topiramato

Se ha demostrado que los inmunoensayos con donantes de enzimas clonadas ("CEDIA<sup>®</sup>" una marca comercial de Roche Diagnostics) es un procedimiento altamente preciso y eficaz para identificar la presencia y determinar la cantidad de fármacos terapéuticos. La tecnología CEDIA<sup>®</sup> se ha descrito en detalle en las siguientes patentes: (a) la  
20 patente de EE.UU. nº 4.708.929 que divulga procedimientos de ensayos competitivos homogéneos; (b) la patente de EE.UU. nº 5.120.653 que divulga una secuencia de ADN recombinante que codifica el fragmento de donante de enzima y un huésped para dicho vector; (c) la patente de EE.UU. Nº 5.604.091 que divulga secuencias de aminoácidos del fragmento de donante de enzima; y (d) la patente de EE.UU. Nº 5.643.734 que enseña kits para ensayos CEDIA. En pocas palabras, la tecnología CEDIA<sup>®</sup> se basa en la competición del topiramato en la muestra  
25 biológica con un análogo acoplado a un fragmento de donante de enzima ("DE") inactivado genéticamente tal como de  $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasa o  $\beta$ -galactosidasa (" $\beta$  gal") de *E.coli*, por la unión a un anticuerpo capaz de unirse a topiramato. En el caso de que haya topiramato presente en la muestra, se une al anticuerpo y deja la porción de del conjugado de análogo de libre para restaurar la actividad enzimática de  $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasa o  $\beta$  gal en la mezcla de reacción para ser capaz de asociarse con fragmentos de aceptores de  
30 enzimas ("EA"). La enzima activa comprendida por el DE y el AE es capaz de producir un producto de reacción cuantificable cuando se expone a un sustrato adecuado. Un sustrato preferido es rojo clorofenol  $\beta$ -D-galactopiranosido ("CPRG"), que se puede escindir mediante la enzima activa en galactosa y CPR, en el que el CPR se mide mediante absorbancia a una longitud de onda aproximada de 570 nm. En el caso de que no haya topiramato presente en la muestra, el anticuerpo se une al conjugado DE-análogo, de modo que se inhibe la asociación de los fragmentos de con los fragmentos de AE y se inhibe la restauración de la actividad enzimática. La cantidad de producto de reacción y el cambio resultante en la absorbancia son proporcionales a la cantidad de topiramato en la muestra.

La Figura 7 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento 410 para realizar un ensayo  
40 CEDIA<sup>®</sup>. De acuerdo con lo anterior se puede obtener un conjugado de topiramato-DE (Bloque 412), que puede ser mediante acoplamiento de un análogo de topiramato con el DE. Asimismo se puede obtener un AE correspondiente al DE (Bloque 414). Adicionalmente se puede obtener una muestra, tal como una muestra biológica de un paciente al que se le está administrando, sospechosa de contener topiramato (Bloque 416). El anticuerpo anti-topiramato, que también puede interactuar con el conjugado topiramato-DE, se puede obtener mediante procedimientos de acuerdo con la presente invención (Bloque 418). Se pueden obtener cantidades o concentraciones conocidas del conjugado topiramato-DE, AE y anticuerpo anti-topiramato y se formulan después en composiciones separadas, tales como en un sistema tampón estándar, para uso en un ensayo de unión competitiva (Bloque 420). El conjugado topiramato-DE y el anticuerpo se combinan después con la muestra biológica en una solución de reacción (Bloque 422). Opcionalmente, el AE también se combina en la solución de reacción en este punto o después tras un tiempo suficiente para que se produzcan interacciones competitivas con el anticuerpo. Se produce una reacción competitiva entre la cantidad conocida del conjugado de topiramato-DE y topiramato en la muestra biológica con la cantidad conocida del anticuerpo anti-topiramato en la solución de reacción (Bloque 424). Después de las reacciones competitivas y se ha introducido el AE en la solución de reacción, se introduce un sustrato DE-AE escindible por la enzima en la solución de reacción (Bloque 426). La actividad enzimática entre la enzima DE-EA y se mide el sustrato escindible por la enzima (Bloque 428), que se puede realizar midiendo la absorbancia de un producto de la escisión u otra técnica de medición bien conocida. La medición de la actividad enzimática se puede usar para determinar si hay o no topiramato presente en la muestra (Bloque 430). Adicionalmente, la comparación de las mediciones obtenidas a partir de la muestra biológica con mediciones estandarizadas obtenidas a partir de patrones de concentración conocidos se puede utilizar para cuantificar la cantidad de topiramato en la muestra (Bloque 432) y, de este modo, identificar la cantidad de topiramato en el paciente (Bloque 434).

Una realización de la presente invención es un sistema de ensayo CEDIA<sup>®</sup>. Un ejemplo de componentes del sistema de CEDIA<sup>®</sup> puede incluir lo siguiente: i) anticuerpos anti-topiramato monoclonales o policlonales capaces de unirse a topiramato, análogo de topiramato y/o topiramato-DE o topiramato-AE; ii) una muestra que se sospecha que contiene topiramato; iii) análogo de topiramato acoplado a un DE o un AE; y iv) uno de un DE o AE que se asociará con el topiramato-DE o topiramato—AE para restaurar la actividad enzimática de forma que hay DE y AE presente

en el sistema. Como alternativa, el sistema de ensayo se puede proporcionar como un kit exclusivo de la muestra. Adicionalmente, el sistema de ensayo puede incluir diversas composiciones tampón, composiciones gradiente de concentración de topiramato o una composición madre de topiramato, y similares.

#### 5 D. Inmunoensayos heterogéneos quimioluminiscentes para topiramato

Un ensayo competitivo usando tecnología de inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente ("CMIA") también se puede usar para evaluar si hay topiramato presente en una muestra. En la técnica se conocen varios tipos de tecnologías de CMIA de inmunoensayos heterogéneos para determinar la presencia y/o la cantidad de una entidad química en una muestra. Algunas tecnologías de CMIA se pueden ilustrar mediante las patentes de EE.UU. N° 6.448.091, 5.798.083, y 5.834.206. Los ensayos de CMIA pueden incluir el uso de anticuerpos anti-topiramato que son capaces de unirse a topiramato y a sus análogos, que están acoplados a partículas, dichas partículas magnéticas o partículas adecuadas para separar mediante filtración, sedimentación y/u otros medios. Adicionalmente, un trazador, que puede incluir un análogo de topiramato unido a un resto quimioluminiscente adecuado, se puede usar para competir con topiramato libre en la muestra del paciente para la cantidad limitada del anticuerpo anti-topiramato sobre la partícula. Una vez que la muestra, el trazador y las partículas de anticuerpo interaccionan y que con una etapa de lavado de rutina se le eliminado el trazador no unido, la cantidad de trazador unido a las partículas de anticuerpo se puede medir mediante quimioluminiscencia, en la que la quimioluminiscencia se expresa en Unidades Lumínicas Relativas (ULR). La cantidad de quimioluminiscencia está relacionada inversamente con la cantidad de fármaco libre en la muestra del paciente y la concentración se determina construyendo una curva estándar usando valores conocidos del fármaco.

La Figura 8 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento 510 para realizar un ensayo CMIA. De acuerdo con lo anterior, se puede obtener un conjugado anticuerpo anti-topiramato-partícula (Bloque 512), que se puede realizar acoplado el anticuerpo a una partícula, tal como una partícula magnética. Asimismo, se puede obtener un compuesto trazador que incluye un análogo de topiramato que tiene un resto quimioluminiscente (Bloque 514). Adicionalmente se puede obtener una muestra, tal como una muestra biológica de un paciente al que se le está administrando, sospechosa de contener topiramato (Bloque 516). Se pueden formular cantidades o concentraciones conocidas del trazador y el conjugado anticuerpo anti-topiramato-partícula en composiciones separadas, tales como en un sistema tampón estándar, para uso en un ensayo de unión competitiva (Bloque 518). El conjugado anticuerpo anti-topiramato-partícula se combina después con la muestra biológica en una solución de reacción (Bloque 520). Se produce una reacción competitiva entre el trazador y el topiramato en la muestra biológica por la unión al conjugado anticuerpo anti-topiramato - partícula en la solución de reacción (Bloque 522). Después de una duración y/o competencia de unión suficiente, el conjugado anticuerpo-partícula se separa de la solución de reacción (Bloque 524). Opcionalmente se puede eliminar todo el topiramato y/o trazador no unido del conjugado anticuerpo-partícula mediante un lavado u otra técnica de separación (Bloque 526). La cantidad de quimioluminiscencia se puede determinar excitando el trazador de modo que el resto quimioluminiscente emita luz por fosforescencia, fluorescencia u otra luminiscencia que es mensurable (Bloque 528). A menudo, la quimioluminiscencia es fluorescencia, que se mide en ULR. La medición de la quimioluminiscencia se puede usar para determinar si hay o no topiramato presente en la muestra (Bloque 530). Adicionalmente, la comparación de las mediciones obtenidas a partir de la muestra biológica con mediciones estandarizadas obtenidas a partir de patrones de concentración conocidos se puede utilizar para cuantificar la cantidad de topiramato en la muestra (Bloque 532) y, de este modo, identificar la cantidad de topiramato en el paciente (Bloque 534).

Una realización de la presente invención es un sistema de ensayo CMIA. Un ejemplo de componentes del sistema de CMIA puede incluir lo siguiente: i) partículas o micropartículas cargadas con anticuerpos monoclonales o policlonales anti-topiramato capaces de unirse a topiramato y a un análogo de topiramato; ii) una muestra sospechosa de contener topiramato; y iii) un trazador del análogo. Como alternativa, el sistema de ensayo se puede proporcionar como un kit exclusivo de la muestra. Adicionalmente, el sistema puede incluir diversas composiciones tampón, composiciones gradiente de concentración de topiramato o una composición madre de topiramato o análogo, y similares.

#### E. Otros inmunoensayos para topiramato

Los análogos de topiramato, conjugados, anticuerpos, inmunógenos y/u otros conjugados descritos en el presente documento también son adecuados para cualquiera de una serie de otros inmunoensayos heterogéneos con una gama de sistemas de detección incluidos, entre otros, inmunoensayos enzimáticos o fluorescentes y/u homogéneos, incluidos, entre otros, ensayos de flujo lateral rápido y matrices de anticuerpos, así como formatos que todavía se han de desarrollar.

Aunque en el presentes documento se han descrito varios ensayos inmunodiagnósticos que usan los análogos de topiramato, conjugados, anticuerpos, inmunógenos y/o trazadores, dichos ensayos también se pueden modificar como se sabe en la técnica. Como tales, se pueden realizar diversas modificaciones de las etapas o actos para realizar dichos inmunoensayos dentro del alcance de la presente invención.

65

## Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar realizaciones de la prevención y no se pretende que sean limitantes. De acuerdo con lo anterior, se han realizado algunos de los ejemplos mediante experimentos y algunos son proféticos basándose en las técnicas, normas y resultados bien conocidos en la técnica. Asimismo, será evidente que la invención puede incluir realizaciones adicionales no ilustradas mediante ejemplos. Adicionalmente, muchos de los ejemplos se han realizado con protocolos experimentales bien conocidos en la técnica usando los análogos de topiramato, antígenos, inmunógenos y anticuerpos anti-topiramato preparados de acuerdo con la presente invención. Por tanto, los ejemplos se pueden complementar con las referencias siguientes: (a) Caryl Griffin et al., *Microparticle Reagent Optimization: A Laboratory Reference Manual from the Authority on Microparticles*, Seradyn (1994); (b) Boehringer Mannheim Corporation Technical Publications Department, *Hitachi Operation Manual: Versión B*, Boehringer Mannheim Corporation Laboratory Diagnostic Division (1992); y (c) the NCCLS, approved guideline agosto 2004

### Ejemplo 1

La Figura 9 es una representación esquemática de una reacción química para convertir el cloruro de topiramato (1) en un análogo aminoetilo de topiramato conjugado con sulfamato (2). En un matraz de fondo redondo, a una solución de aproximadamente 0,3 ml de N,N-diisopropiletilamina y 0,5 ml de DMF se añaden 0,16 ml de una solución de etilendiamina. El matraz se enfría en un baño de hielo y se agita en gas argón ("Ar") antes de añadir una solución de 203 mg de cloruro de topiramato e 1,0 ml de DMF para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita en gas Ar durante 12 horas. El disolvente se evapora a presión reducida para formar un residuo que se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con un eluyente de metanol. Las fracciones que contienen un análogo aminoetilo de topiramato (2) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 90 mg.

### Ejemplo 2

Haciendo referencia continua a la Figura 9 se representa una representación esquemática de una reacción química para convertir el análogo aminoetilo de topiramato (2) en otro análogo que tiene un enlazador largo y un éster activo (3). En un matraz de fondo redondo que está en un baño de hielo, a una solución de 2 ml de DMF anhidro y 0,05 ml de N,N-diisopropiletilamina se añaden aproximadamente 150 mg de DSS y después se agitan en Ar. A continuación, al matraz se añaden gota a gota aproximadamente 45 mg del análogo aminoetilo de topiramato (2) en 1 ml de DMF (prerrefrigerado en un baño de hielo) para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita en un baño de hielo en Ar durante 3 horas antes de evaporar el disolvente a presión reducida para formar un residuo que se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con un eluyente de acetato de etilo:hexano (8:2). Las fracciones que contiene el éster activo de topiramato (3) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 20 mg.

### Ejemplo 3

La Figura 10A es una representación esquemática de una reacción química para convertir el topiramato (1) en un análogo succinilo de topiramato conjugado con sulfamato (4). En un matraz de fondo redondo de 250 ml, una solución de aproximadamente 2 g de topiramato en 20 ml de THF (anhidro) se combina con aproximadamente 2 ml de N,N-diisopropiletilamina y se agita en Ar. A la solución anterior se añaden aproximadamente 1,24 g de anhídrido succínico y 50 mg de DMAP para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita en Ar durante 12 horas y el disolvente se evapora a presión reducida para formar un residuo. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones que contienen el derivado succinilo de topiramato (4) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 200 mg.

### Ejemplo 4

La Figura 10B es una representación esquemática de una reacción química para convertir el topiramato (1) en un análogo glutarilo de topiramato conjugado con sulfamato (5). En un matraz de fondo redondo de 250 ml, una solución de 400 mg de topiramato en 20 ml de THF (anhidro) se combina con aproximadamente 0,8 ml de N,N-diisopropiletilamina y se agita en Ar. Se añaden aproximadamente 520 mg de anhídrido glutárico y 20 mg de DMAP para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita a 60 °C durante 60 horas y el disolvente se evapora a presión reducida para formar un residuo. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones que contienen el derivado glutarilo de topiramato (5) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 160 mg.

### Ejemplo 5

La Figura 11 es una representación esquemática de una reacción química para convertir el análogo aminoetilo de topiramato (2) en un análogo de topiramato conjugado con sulfamato (6) que tiene un grupo éster alifático. En un matraz de fondo redondo de 250 ml, una solución de 50 mg de aminoetil topiramato (2) en 10 ml de DMF (anhidro) se combina con aproximadamente 0,8 ml de N,N-diisopropiletilamina y se agita en Ar. Se añaden aproximadamente

100 mg de t-butil-4-bromobutirato y 20 mg de DMAP para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita a 80 °C durante 24 horas y el disolvente se evapora a presión reducida para formar un residuo. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones que contienen el análogo de topiramato conjugado con sulfamato (6) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 30 mg.

### **Ejemplo 6**

Haciendo referencia continua a la Figura 11 se representa una representación esquemática de una reacción química para convertir el análogo de topiramato conjugado con sulfamato (6) en otro análogo de topiramato conjugado con sulfamato (7) que tiene un grupo de ácido carboxílico. En un matraz de fondo redondo de 250 ml, una solución de 50 mg de análogo de topiramato conjugado con sulfamato (6) en 5 ml de ácido trifluoroacético se combina con 5 ml de diclorometano y se agita en Ar. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos y el disolvente se evapora a presión reducida para formar un residuo. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones que contienen el análogo de topiramato conjugado con sulfamato (7) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 20 mg.

### **Ejemplo 7**

Haciendo referencia continua a la Figura 11 se representa una representación esquemática de una reacción química para convertir el análogo de topiramato conjugado con sulfamato (7) en un éster activado de topiramato (8) que tiene un grupo NHS activo. Específicamente, una solución de 100 mg del análogo de topiramato (7) en 7 ml de DMF anhidro se enfría hasta 0 °C y se añaden 0,1 ml de N,N-diisopropiletilamina para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se hace reaccionar mediante la adición de 110 mg de tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio. La mezcla de reacción se deja calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/metanol como eluyente, dando aproximadamente 60 mg del éster activo de topiramato (8).

### **Ejemplo 8**

La Figura 12 es una representación esquemática de una reacción química para convertir el topiramato (1) en un análogo fenilo de topiramato conjugado con sulfamato (9). En un matraz de fondo redondo de 250 ml, una solución de 100 mg de topiramato en 10 ml de diclorometano se combina con 60 mg de 4-carboxibenzaldehído y 40 mg de cianoborohidruro y se agita en Ar. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 día. La reacción se inactiva con agua y se extrae tres veces con 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se combinan y se secan sobre sulfato sódico anhidro, se filtran y el disolvente se elimina en un evaporador rotatorio. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones que contiene el análogo fenilo de topiramato (9) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 50 mg.

### **Ejemplo 9**

Haciendo referencia continua a la Figura 12 se representa una representación esquemática de una reacción química para convertir un análogo fenilo de topiramato (9) en un éster de NHS activado del análogo fenilo (10). Específicamente, una solución de 90 mg del análogo fenilo de topiramato (9) en 5 ml de DMF anhidro se enfría hasta 0 °C y se añaden 0,1 ml de N,N-diisopropiletilamina para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se hace reaccionar mediante la adición de 95 mg de tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio. La mezcla de reacción se deja calentar hasta la temperatura ambiente y se agita durante la noche. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/metanol como eluyente, dando aproximadamente 50 mg del éster activo del análogo fenilo (10).

### **Ejemplo 10**

La Figura 13 es una representación esquemática de una reacción química para convertir el topiramato (1) en un análogo ácido butírico de topiramato conjugado con sulfamato (11). En un matraz de fondo redondo de 250 ml, una solución de 400 mg de topiramato en 10 ml de diclorometano se combina con 100 mg de cianoborohidruro de sodio y 100 mg de semialdehído succínico (15 % en peso en agua) y se agita a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactiva con 20 ml de agua desionizada, se acidifica con HCl 0,1N y se extrae tres veces con 40 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se combinan y se secan sobre sulfato sódico anhidro, se filtran y el disolvente se elimina en un evaporador rotatorio. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones que contiene el análogo ácido butírico de topiramato (11) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 160 mg.

**Ejemplo 11**

Haciendo referencia continua a la Figura 13 se representa una representación esquemática de una reacción química para convertir un análogo ácido butírico de topiramato (11) en un éster de NHS activado del análogo ácido butírico (12). Específicamente, una solución de 100 mg del análogo ácido butírico de topiramato (11) en 5 ml de DMF anhidro se enfría hasta 0 °C y se añaden 0,1 ml de N,N-diisopropiletilamina para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se hace reaccionar mediante la adición de 105 mg de tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio. La mezcla de reacción se deja calentar hasta la temperatura ambiente y se agita durante la noche. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/metanol como eluyente, dando aproximadamente 500 mg del éster activo del análogo ácido butírico (12).

**Ejemplo 12**

La Figura 14 es una representación esquemática de una reacción química para convertir el topiramato (1) en un análogo 9-hidroxi de topiramato (13). En un matraz de fondo redondo de 100 ml, una solución de 40 mg de 9-hidroxitopiramato en 10 ml de THF (anhidro) se combina con 0,1 ml de N,N-diisopropiletilamina y 0,1 ml de etil-4-isocianatobutirato y se agita en Ar. La mezcla de reacción se agita a 80 °C durante dos horas. La reacción se enfría hasta la temperatura ambiente y el disolvente se elimina en un evaporador rotatorio para producir un residuo. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones que contienen análogo éster de etilo de topiramato (13) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 20 mg.

**Ejemplo 13**

Haciendo referencia continua a la Figura 14, se representa una representación esquemática de una reacción química para convertir el topiramato en un análogo 9-hidroxi de topiramato (14). En un matraz de fondo redondo de 10 ml, una solución de 40 mg del análogo 9-hidroxi-topiramato (13) en 2 ml de metanol se combina con 2 ml de NaOH acuoso 1N. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante un día antes de concentrarse a presión reducida para producir un residuo. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones que contiene el análogo carboxilato de topiramato (14) se combinan y se concentran, para dar aproximadamente 20 mg.

**Ejemplo 14**

Haciendo referencia continua a la Figura 14 se representa una representación esquemática de una reacción química para convertir el análogo carboxilato de topiramato (14) en un éster de NHS activado del análogo de topiramato (15). Específicamente, una solución de 100 mg del análogo carboxilato de topiramato (11) en 5 ml de DMF anhidro se enfría hasta 0 °C y se añaden 0,1 ml de N,N-diisopropiletilamina para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se hace reaccionar mediante la adición de 105 mg de tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio. La mezcla de reacción se deja calentar hasta la temperatura ambiente y se agita durante la noche. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/metanol como eluyente, dando aproximadamente 500 mg del éster activo del análogo de topiramato (15).

**Ejemplo 15**

La Figura 15 es una representación esquemática de una reacción química para convertir un análogo de topiramato en un antígeno de topiramato (16) con fines ilustrativos. El antígeno de topiramato (16) se basa en la patente de EE.UU. Nº 5.952.182. Una solución de 109 mg de N-carboximetil-topiramato y 40 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) en 2 ml de dimetilacetamida y 0,2 ml de N,N-diisopropiletilamina se enfría en un baño de hielo seco/isopropanol (-20 °C a -15 °C) y se trata con 100 µl de dicitclohexicarbodiimida 3,15 M (240 mg de DCC en dimetilacetamida), para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita mientras se enfría en el baño de hielo seco durante 15 minutos antes de añadir otros 100 µl de la solución de DCC. La mezcla de reacción se agita durante la noche en Ar y se deja calentar hasta la temperatura ambiente en un matraz de fondo redondo con un agitador magnético, aproximadamente 4 ml de tampón PBS 0,1 M a pH 7,2 que tiene aproximadamente 70 mg de proteína BSA se agita mientras se está enfriando en un baño de hielo. La solución de proteínas se agita durante 30 minutos y gota a gota se añade 1 ml de DMSO. La solución de proteínas refrigerada anterior se añade a la mezcla de reacción de topiramato gota a gota y se deja agitar durante la noche en un cuarto frío (4 °C). El conjugado resultante se introduce en un tubo de diálisis (PM de corte 10.000) y después se dializa en 1 l de DMSO al 20 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2 a temperatura ambiente, seguido después por cuatro cambios con PBS a pH 7,2, a 4 °C (1 L cada vez durante al menos 6 horas cada uno). La concentración de proteínas del antígeno (16) se determina como aproximadamente 5,0 mg/ml usando un ensayo proteico con azul de Coomassie (Bio-Rad).

**Ejemplo 16**

La Figura 15 es una representación esquemática de una reacción química para convertir un análogo de topiramato en un inmunógeno de topiramato (17) con fines ilustrativos. El inmunógeno de topiramato (17) se basa en la patente de EE.UU. N° 5.952.182. Una solución de 109 mg de N-carboximetil-topiramato y 40 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) en 2 ml de dimetilacetamida y 0,2 ml de N,N-diisopropiletilamina se enfría en un baño de hielo seco/isopropanol (-20 °C a -15 °C) y se trata con 100 µl de diclohexilcarbodiimida 3,15 M (240 mg de DCC en dimetilacetamida), para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita mientras se enfría en el baño de hielo seco durante 15 minutos antes de añadir otros 100 µl de la solución de DCC. La mezcla de reacción se agita durante la noche en Ar y se deja calentar hasta la temperatura ambiente durante la reacción. En un matraz de fondo redondo con un agitador magnético, aproximadamente 8 ml de tampón PBS 0,1 M a pH 7,2 que tiene aproximadamente 80 mg de la proteína KLH se agita enfriándose en un baño de hielo. La solución de proteínas se agita durante 30 minutos y gota a gota se añade 1 ml de DMSO. La solución de proteínas refrigerada anterior se añade a la mezcla de reacción de topiramato gota a gota y se deja agitar durante la noche en un cuarto frío (4 °C). El conjugado resultante se introduce en un tubo de diálisis (PM de corte 10.000) y después se dializa en serie en 1 l de DMSO al 20 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2 a temperatura ambiente, seguido después por cuatro cambios con PBS a pH 7,2, a 4 °C (1 L cada vez durante al menos 6 horas cada uno). La concentración de proteínas del antígeno (17) se determina como aproximadamente 1,6 mg/ml usando un ensayo proteico con azul de Coomassie (Bio-Rad).

**Ejemplo 17**

La Figura 16 es una representación esquemática de una reacción química para convertir un análogo de topiramato (3) en un inmunógeno (18). Una solución de 80 mg de hemocianina de lapa californiana (KLH) en 8 ml de PBS a pH 7,2 (fosfato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,15 M) se enfría en un baño de hielo. A la solución de KLH se añaden gota a gota aproximadamente 5,4 ml de DMSO y se mantiene por debajo de la temperatura ambiente. Una solución de 20,4 mg del análogo de topiramato (3) en 1,6 ml de DMS se añade gota a gota a la solución de KLH para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante 40 horas. El inmunógeno KLH resultante (18) se introduce en un tubo de diálisis (PM de corte 10.000) y se dializa en serie en 1 l de DMSO al 35 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2 a temperatura ambiente, seguido después por cuatro cambios con PBS a pH 7,2, a temperatura ambiente (1 l cada vez durante al menos 6 horas cada uno). La concentración de proteínas del inmunógeno de KLH (18) se determina como aproximadamente 2,19 mg/ml usando un ensayo proteico con azul de Coomassie (Bio-Rad).

**Ejemplo 18**

La Figura 17 es una representación esquemática de una reacción química para convertir un análogo succinilo o glutarilo de topiramato (4) en un antígeno (19). Aproximadamente 500 mg de BSA se introducen en un matraz de fondo redondo de 250 ml y se combina con aproximadamente 37,5 ml de PBS. La mezcla se agita en un baño de hielo durante una hora y gota a gota se añaden 12,5 ml de DMSO a la solución de BSA durante un intervalo de 10 minutos. La solución resultante se agita en un baño de hielo durante 3 horas adicionales. En otro matraz de fondo redondo, aproximadamente 170 mg del análogo succinilo de topiramato (4) se combinan con 2 ml de DMF y 0,15 ml de N,N-diisopropiletilamina y se agita en un baño de hielo en Ar durante 20 minutos. A la solución del análogo de topiramato se añaden aproximadamente 130 mg de O,N-succinimidilo, tetrafluoroborato de N,N,N,N-tetrametiluronio y después se detiene con un tabique de caucho y se agita a 4 °C durante 4 horas. La mezcla del análogo de topiramato se añade gota a gota a la solución de BSA anterior durante 20 minutos. El antígeno de topiramato resultante se introduce en un tubo de diálisis (PM de corte 10.000) y se dializa en serie en 1 l de DMSO al 30 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2 a temperatura ambiente, seguido después por cuatro cambios con PBS a pH 7,2, a temperatura ambiente (1 L cada vez durante al menos 6 horas cada uno). La concentración de proteínas del antígeno de topiramato (19) se determina como aproximadamente 5,0 mg/ml usando un ensayo proteico con azul de Coomassie (Bio-Rad).

**Ejemplo 19**

La Figura 18 es una representación esquemática de una reacción química para convertir un análogo succinilo de topiramato (3) en un antígeno (20). Una solución de 80 mg de BSA en 4 ml de PBS a pH 7,2 (fosfato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,15 M) se enfría en un baño de hielo. A la solución de BSA se añaden gota a gota aproximadamente 5,4 ml de DMSO y se mantiene por debajo de la temperatura ambiente. Una solución de 20,4 mg del análogo de topiramato (3) en 1,6 ml de DMS se añade gota a gota a la solución de BSA para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante 40 horas. El conjugado de BSA resultante (20) se introduce en un tubo de diálisis (PM de corte 10.000) y se dializa en serie en 1 l de DMSO al 35 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2, después 1 l de DMSO al 10 % en PBS a pH 7,2 a temperatura ambiente, seguido después por cuatro cambios con PBS a pH 7,2, a temperatura ambiente (1 l cada vez durante al menos 6 horas cada uno). La concentración de proteínas del conjugado de BSA (20) se determina como aproximadamente 5 mg/ml usando un ensayo proteico con azul de Coomassie (Bio-Rad).

**Ejemplo 20**

Se obtiene una composición que contiene anticuerpo policlonal y se realiza un ensayo con el fin de determinar la cantidad de reactividad cruzada del anticuerpo policlonal con topiramato y un metabolito primario de topiramato. Se usa una cantidad conocida de topiramato para reaccionar con un anticuerpo anti-topiramato. Se usa una concentración conocida de topiramato para calcular la cantidad de reactividad cruzada entre la preparación de anticuerpos y el metabolito hidroxilado (21) como se muestra en la Figura 19. El porcentaje de reactividad cruzada equivale a 100 veces la concentración observada de topiramato en µg/ml, que después se divide por la concentración de los metabolitos añadidos en µg/ml. No se observa reactividad cruzada en las muestras que contiene dichos metabolitos.

**Ejemplo 21**

Se prepara un anticuerpo policlonal que se une a topiramato usando un análogo de topiramato que tiene un conjugado inmunogénico. Más particularmente, los inmunógenos de topiramato (17) y (18) que tienen el resto inmunogénico de KLH se usan para generar el anticuerpo policlonal anti-topiramato. Una composición inmunogénica se prepara mezclando aproximadamente 0,5 ml de un inmunógeno (17) o (18) que contiene la composición con aproximadamente 0,5 ml de adyuvante de Freund. El cóctel inmunogénico de 1 ml resultante se inyecta después en un animal, tal como una oveja o un conejo. Las inyecciones inmunogénicas posteriores que tienen el mismo cóctel se administran al animal cada cuatro semanas con el fin de hacer que el animal produzca anticuerpo policlonal anti-topiramato. Los sueros de los animales se criban mediante ELISA usando los mismos antígenos, como se describe más adelante. Adicionalmente, el programa de anticuerpo policlonal se puede implementar con antígenos de topiramato (16), (19), (20) y similares.

**Ejemplo 22**

Las placas de ELISA para usar en un ensayo ELISA se preparan para estudiar el anticuerpo policlonal preparado como se describe en el Ejemplo 21. Como tal, varios antígenos de topiramato (16), (19), y (20) se recubren sobre diferentes placas de ELISA antes de someterlos al anticuerpo anti-topiramato y competir con el topiramato libre. Más particularmente, los antígenos de topiramato se diluyen en tampón de revestimiento y después se añaden a los pocillos de la placa de ELISA. Después de incubar la placa de ELISA durante 60 minutos a 37 °C, el disolvente en el tampón de revestimiento se decanta y se añade a la placa un tampón de bloqueo. La placa se incuba de nuevo durante 60 minutos a 37 °C y el disolvente en el tampón de bloqueo se decanta de la placa. Después, la placa de ELISA se almacena con el agente de bloqueo en los pocillos a 2-8 °C durante hasta 1 semana.

**Ejemplo 23**

El título del anticuerpo para un anticuerpo policlonal preparado de acuerdo con el Ejemplo 21 con inmunógeno (17) se determina usando placas de ELISA como se preparan en el Ejemplo 22. Como tal, se realiza una dilución en serie para producir el mismo volumen de 100 µl en cada pocillo. Las diluciones del anticuerpo se preparan entre 1:10 y 1:2000 en PBS a pH 7,4 y que contienen 0,1 % de BSA. Las muestras se diluyen 10 veces y las diluciones se inician a 1:100 y se diluyen en serie 10 veces en la placa. Después, a cada pocillo de la placa de ELISA se añaden 100 µl de una muestra de anticuerpo. Después, la placa se incuba durante 60 minutos a 37 °C y se lava tres veces con 250 µl de PBS a pH 7,4 con 0,05 % de Tween. Después, a cada pocillo de la placa se añaden 125 µl de un segundo antígeno diluido (en PBS, pH 7,4), que es diferente del antígeno anterior revestido sobre la placa. El título se determina experimentalmente incubando la placa durante 60 minutos a 37 °C, que después se lava tres veces con 250 µl de PBS a pH 7,4 con 0,05 % de Tween. Después de lavar, a cada pocillo de las placas se añaden aproximadamente 125 µl de ABTS y la placa se incuba de nuevo durante 20 minutos. La placa se lee a 405 nm y los resultados del título se proporcionan en la Tabla 1.

**TABLA 1**

Nº de oveja	Inmunógeno	Título de ELISA		
		Antígeno 16	Antígeno 19	Antígeno 20
5481	17	210.000	85.000	130.000
5492	17	230.000	44.000	83.000

Estos resultados indican que el título de anticuerpos producidos con el inmunógeno (17) no es suficiente para un inmunoensayo de aglutinación de micropartículas. Esto es porque el inmunoensayo de aglutinación de micropartículas debería realizarse con un título mucho más alto. Como tal, el inmunógeno (17) no produce suficientes anticuerpos para usar en algunos protocolos de ensayos inmunodiagnósticos comerciales.



**Ejemplo 24**

La avidéz de los anticuerpos anti-topiramato preparados con inmunógeno (17) por los análogos de topiramato se determina mediante un estudio de inhibición de la unión. Como tales, las muestras se preparan en 1 ml de PBS a pH 7,4 con 0,1 % de BSA. Una composición que tiene un título del 30 % de la Umáx o título del 50 % de la Umáx se usa para dividir el valor del título obtenido en aproximadamente la mitad del valor del título. Usando un 30 % de la Umáx, un título del anticuerpo de 1:10.000 se diluye a 1:5.000 durante la etapa de preparación de la muestra. Aproximadamente 50 µl del topiramato a concentraciones o valores del calibrador diferentes (0, 2, 4, 8, 16, 32 µg/ml) se aplican después a una placa como se prepara de acuerdo con el Ejemplo 22. Aproximadamente 50 µl del anticuerpo diluido se dispensan en la placa y las composiciones en la placa se mezclan durante 1 minuto en un agitador de placa horizontal. La placa se caracteriza por una primera hilera que no contiene topiramato o anticuerpo anti-topiramato, en la que la primera hilera se usa como control negativo. Una segunda hilera que no contiene topiramato se usa como control positivo. La placa se incuba durante 60 minutos y se lava tres veces con 250 µl de PBS a pH 7,4 con 0,05 % de Tween. Aproximadamente 125 µl de un segundo conjugado de anticuerpos diluido, tales como antígenos (16), (19), o (20), en PBS a pH 7,4 se añaden a cada pocillo de la placa. El título se determina experimentalmente incubando la placa durante 60 minutos a 37 °C y se lava 3 veces con 250 µl de PBS, a pH 7,4 con 0,05 % de tween. Después, a cada pocillo de la placa se añaden aproximadamente 125 µl de sustrato ABTS y se incuba durante 20 minutos. La placa se lee a 405 nm y los resultados del título se proporcionan en las Tablas 2 y 3.

**TABLA 2**

Nº de conejo 5481	Antígeno 16		Antígeno 19		Antígeno 20	
	Abs	B/Bo	Abs	B/Bo	Abs	B/Bo
0	0,76	1,00	0,83	1,00	0,60	1,00
2	0,29	0,38	0,33	0,40	0,32	0,53
4	0,26	0,34	0,25	0,30	0,30	0,50
8	0,18	0,24	0,20	0,24	0,25	0,42
16	0,15	0,20	0,18	0,22	0,22	0,37
32	0,11	0,14	0,15	0,18	0,18	0,30

**TABLA 3**

Nº de conejo 5492	Antígeno 16		Antígeno 19		Antígeno 20	
	Abs	B/Bo	Abs	B/Bo	Abs	B/Bo
0	0,45	1,00	0,83	1,00	0,7	1,00
2	0,25	0,56	0,31	0,38	0,45	0,64
4	0,20	0,44	0,23	0,28	0,41	0,59
8	0,15	0,33	0,19	0,23	0,38	0,54
16	0,13	0,29	0,17	0,20	0,38	0,54
32	0,01	0,02	0,15	0,18	0,28	0,40

Los perfiles de inhibición (B/Bo) en las Tablas 2 y 3 muestran que el anticuerpo anti-topiramato que se genera con el inmunógeno (17). El inmunógeno (17) también se usa en un inmunoensayo FPIA comercial para mostrar los cambios crecientes en el porcentaje de inhibición durante el intervalo del ensayo.

**Ejemplo 25**

El título den anticuerpo para un anticuerpo policlonal preparado de acuerdo con el Ejemplo 21 con inmunógeno (18) se determina usando placas de ELISA preparadas en el Ejemplo 22. El título se determina usando un protocolo experimental sustancialmente similar con el ejemplo 23. La placa se lee a 405 nm y los resultados se proporcionan en la Tabla 4.

**TABLA 4**

Nº de oveja	Inmunógeno	Título de ELISA		
		Antígeno 16	Antígeno 19	Antígeno 20
5490	18	320.000	210.000	980.000
5495	18	320.000	170.000	1.200.000

El funcionamiento óptimo de los ensayos inmunodiagnósticos se puede conseguir con un título elevado (requieren menos anticuerpo, más barato) y buena absorbancia. Los títulos más altos son especialmente importantes en un inmunoensayo de aglutinación de micropartículas. El inmunógeno (18) es más inmunogénico que el inmunógeno (17) debido a un enlazador más largo que proporciona un epítipo más accesible. Los resultados de la Tabla 4 indican que el título de anticuerpo producido con el inmunógeno (18) es suficiente para usar en un ensayo inmunodiagnóstico de topiramato comercial, tal como en un inmunoensayo de aglutinación de micropartículas.

**Ejemplo 26**

10 La avidéz de los anticuerpos anti-topiramato preparados con el inmunógeno (18) para los análogos de topiramato se determina mediante un estudio de inhibición de la unión realizado con un protocolo experimental sustancialmente similar al del Ejemplo 24. La placa se lee a 405 nm y los resultados se proporcionan en las Tablas 5 y 6.

**TABLA 5**

Nº de conejo 5490	Antígeno 16		Antígeno 19		Antígeno 20	
	Abs	B/Bo	Abs	B/Bo	Abs	B/Bo
0	0,72	1,00	0,55	1,00	0,4	1,00
2	0,25	0,35	0,10	0,18	0,25	0,63
4	0,20	0,28	0,06	0,10	0,24	0,60
8	0,15	0,21	0,04	0,07	0,22	0,55
16	0,12	0,17	0,03	0,06	0,21	0,53
32	0,10	0,14	0,02	0,04	0,20	0,50

15

**TABLA 6**

Nº de conejo 5495	Antígeno 16		Antígeno 19		Antígeno 20	
	Abs	B/Bo	Abs	B/Bo	Abs	B/Bo
0	0,72	1,00	0,66	1,00	0,34	1,00
2	0,25	0,35	0,13	0,20	0,18	0,53
4	0,28	0,39	0,08	0,12	0,17	0,50
8	0,15	0,21	0,05	0,08	0,16	0,47
16	0,12	0,17	0,04	0,06	0,14	0,41
32	0,10	0,14	0,02	0,03	0,11	0,32

20 Las tablas 5 y 6 muestran que los perfiles de inhibición (B/Bo) del anticuerpo anti-topiramato generados con el inmunógeno (18). Los cambios en B/Bo parecen aumentar durante el intervalo del ensayo. Por tanto, el anticuerpo es adecuado para el inmunoensayo.

**Ejemplo 27**

25 Un ensayo imunoturbidimétrico o QMS<sup>®</sup>, que es un experimento imunoturbidimétrico potenciado por partículas homogéneas se realiza para analizar los anticuerpos policlonales preparados como en el Ejemplo 21. El ensayo QMS<sup>®</sup> para el topiramato se realiza usando un kit de dos reactivos líquidos listo para usar, que contiene: R1, que está compuesto por anticuerpos policlonales de oveja que se unen con topiramato preparado a partir del inmunógeno (18) a menos de < 1 % en tampón bis-tris con aproximadamente 0,05 % de azida sódica; y R2, que está compuesto por micropartículas revestidas por topiramato con el antígeno (22) a menos de, 0,5 % con azida sódica al 0,05 %.

35 Adicionalmente se pueden preparar muestras adecuadas a partir de suero y plasma. Se puede recoger el suero mediante técnicas de venopunción estándar y se introduce en tubos de vidrio o de plástico con o sin barreras de gel. Para garantizar que se ha producido una completa formación de los coágulos antes de la centrifugación, algunas muestras, especialmente las de pacientes que reciben terapia anticoagulante o trombolítica, pueden exhibir un aumento del tiempo de coagulación. En el caso en el que la muestra se centrifuga antes de que se forme un coágulo completo, la presencia de fibrina puede producir resultados erróneos. De acuerdo con lo anterior, el suero se puede separar de los glóbulos rojos en cuanto sea posible la obtención. El plasma también se puede usar con anticoagulantes aceptables, tal como heparina de litio, heparina sódica, EDTA potásico y un separador de plasma en gel de heparina. El plasma se puede obtener mediante técnicas de venopunción estándar y se introduce en tubos de vidrio o de plástico. Asimismo, la centrifugación se usa para garantizar la adecuada eliminación de las plaquetas. El plasma se puede separar de los glóbulos rojos en cuanto sea posible la obtención. Las muestras que contienen materia particulada o glóbulos rojos pueden dar resultados inconsistentes, pero se pueden centrifugar antes de

40

analizar a 8.000 a 10.000 RCF recomendados durante 10 minutos para producir una muestra adecuada.

El procedimiento de ensayo se inicia diluyendo la muestra porque las muestras con topiramato se pueden usar para generar resultados que superan el valor del calibrador más alto. Como tal, las muestras se pueden diluir manualmente o usando un protocolo de dilución integrado automático. El ensayo se basa en una competición por los sitios de unión del anticuerpo específicos para topiramato entre el fármaco en la muestra y el fármaco recubierto sobre una micropartícula de reactivo de micropartícula recubierta con topiramato se aglutina rápidamente en presencia del reactivo de anticuerpo anti-topiramato y en ausencia de cualquier fármaco competidor en la muestra. La tasa de cambio de absorbancia se mide fotométricamente y es directamente proporcional a la tasa de aglutinación de las partículas. Cuando se añade una muestra que contiene lamotrigina, la reacción de aglutinación se inhibe parcialmente, ralentizando la tasa de cambio de la absorbancia. Se puede obtener una curva de inhibición de aglutinación clásica dependiente de la concentración, con una tasa máxima de aglutinación a la concentración de topiramato más baja (a cero µg/ml) y la tasa de aglutinación más baja a la concentración de topiramato más alta (32 µg/ml).

El ensayo de topiramato QMS<sup>®</sup> se inicia después de calibrarse usando un procedimiento de calibración completo (6 puntos). El QMS<sup>®</sup> se realiza según se indica en los manuales de operación de acuerdo con la experiencia media en la técnica. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

**TABLA 7**

Anticuerpo policlonal R1	Tasa (Absorbancia delta)
Muestra de topiramato (µg/ml)	Látex recubierto con antígeno de topiramato (19)
0	193
2	159
4	122
8	60
16	16
32	4

Los resultados mostrados en la Tabla 7 indican que las partículas de látex recubiertas con el antígeno de topiramato (19) pueden competir con eficacia con topiramato por el anticuerpo anti-topiramato. Como tal, el antígeno de topiramato (18) se puede usar en ensayos inmunoturbidimétricos, especialmente cuando se acopla con una partícula de látex.

**Ejemplo 28**

La linealidad se puede medir con el fin de ilustrar una capacidad para producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración de un analito en la muestra de ensayo. Como tal, la linealidad normalmente se refiere a una respuesta del sistema global y la linealidad de un sistema se puede medir analizando los niveles de un analito, que se conocen mediante formulación o relativo conocido entre sí. Cuando los resultados del sistema se representan contra estos valores, el grado hasta el cual la curva representada se adecua a una línea recta es una medida de la linealidad de un sistema.

El protocolo para demostrar el intervalo lineal de un procedimiento de medición cuantitativa es bien conocido en la materia. En pocas palabras, el protocolo se usa para evaluar la linealidad y se analizan las muestras con una matriz adecuada a las muestras. Se preparan las siguientes muestras: preparar 1 µg/ml de la muestra de topiramato mediante dilución de Cal B (2,0 µg/ml) con Cal A (0 µg/ml); preparar 3 µg/ml de la muestra de topiramato mediante dilución de Cal C (4,0 µg/ml) con Cal B (2,0 µg/ml); preparar 6 µg/ml de la muestra de topiramato mediante dilución de Cal D (8,0 µg/ml) con Cal C (4,0 µg/ml); preparar 11,9 µg/ml de la muestra de topiramato mediante dilución de Cal E (15,9,0 µg/ml) con Cal C (8,0 µg/ml); y preparar 23,5 µg/ml de la muestra de topiramato mediante dilución de Cal F (31,7 µg/ml) con Cal E (15,9 µg/ml).

Los datos se recogen después de analizar una muestra o un material de control de calidad y se indican como el resultado promedio de la prueba, que se denomina recuperación. El porcentaje de recuperación se calcula según la siguiente ecuación:

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración media recuperada}}{\text{Concentración prevista}} \times 100$$

Las muestras se analizan aleatoriamente durante un único ciclo y el porcentaje de recuperación se proporciona en la Tabla 8.

TABLA 8

Concentración teórica de topiramato ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración recuperada de topiramato ( $\mu\text{g/ml}$ )	% de recuperación
1	0,94	94,0 %
2	2,04	102,0 %
3	3,06	102,0 %
4	4,05	101,3 %
6	6,03	100,5 %
8	7,82	97,8 %
11,9	11,62	97,6 %
15,9	15,59	98,1 %
23,5	23,14	98,5 %
31,7	30,51	96,2 %
Percentil Alto de la Media 98,8 %		

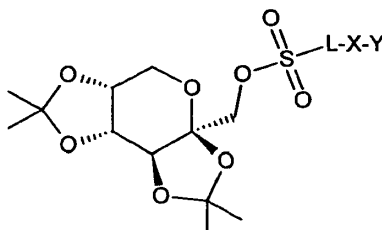
- 5 El porcentaje de la recuperación está dentro del intervalo (115 % a 85 %) Los datos soportan el funcionamiento de sensibilidad y precisión necesarias en ensayos inmunodiagnósticos comerciales. La linealidad de los resultados se representa gráficamente en la Figura 20.

10 La presente invención puede estar contemplada en otras formas específicas sin desviarse del espíritu o las características esenciales de la misma. Las realizaciones descritas se tienen que considerar en todos los aspectos únicamente como ilustrativas y no restrictivas. Por tanto, el alcance de la invención viene indicado por las reivindicaciones adjuntas más que por la descripción anterior. Todos los cambios que vienen con el significado e intervalo de equivalencia de las reivindicaciones deben contemplarse dentro de su alcance.

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema para usar en un ensayo inmunodiagnóstico para detectar la presencia de topiramato en una muestra, comprendiendo el sistema:

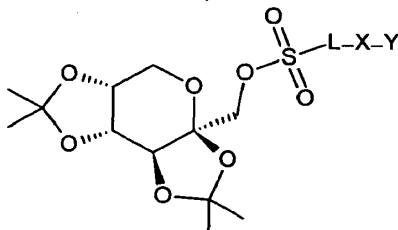
- 5 un anticuerpo anti-topiramato producido contra una composición inmunogénica que incluye un inmunógeno que tienen una estructura de fórmula 1, en el que L-X-Y es  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{CO-Z}$ , en donde Z es un resto inmunogénico seleccionado de uno de BSA o KLH; y



10

Fórmula 1

un análogo de topiramato que tiene una estructura química de Fórmula 1;



15

Fórmula 1

en la que:

- 20 L es uno del grupo  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}$ ,  $\text{NHCO}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{COO}$  o  $\text{O}$ ;  
 X es al menos uno de un enlace entre L e Y, un grupo aromático o un grupo alifático; y  
 Y se selecciona del grupo que consiste en alifático, alcohol, amina, amida, ácido carboxílico, aldehído, éster, éster activado, éster alifático, imidoéster, isocianato, isotiocianato, anhídrido, tiol, tiolactona, diazonio, maleimido, NHS, O-NHS y un enlazador derivado de los mismos acoplado a un grupo operativo.

- 25 2. Un sistema como en la reivindicación 1, en el que el grupo operativo se selecciona del grupo que consiste en proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, polipéptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, ácidos teicoicos, isótopos radiactivos, enzimas, fragmentos enzimáticos, fragmentos de donantes de enzima, fragmentos aceptores de enzimas, sustratos de enzimas, inhibidores de enzimas, coenzimas, restos fluorescentes, restos fosforescentes, restos de regulación por aumento anti-stokes, restos quimioluminiscentes, restos luminiscentes,  
 30 colorantes, sensibilizantes, partículas, micropartículas, partículas magnéticas, soportes sólidos, liposomas, ligandos, receptores, isótopos radiactivos de hapteno y combinaciones de los mismos.

3. Un sistema como en la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

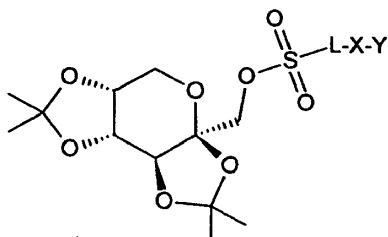
- 35 4. Un sistema como en la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5. Un sistema como en la reivindicación 2, que además comprende al menos uno de los siguientes:

- 40 una composición madre de topiramato;  
 una serie de composiciones que contienen topiramato a concentraciones diferentes, formando la serie de composiciones un gradiente de concentraciones;  
 el análogo de topiramato que tiene un resto trazador;  
 el análogo de topiramato que tiene una micropartícula;  
 el anticuerpo acoplado a una micropartícula;  
 45 el análogo de topiramato que tiene un donante de enzimas y un correspondiente aceptor de enzimas;  
 el análogo de topiramato que tiene un aceptor de enzimas y un correspondiente donante de enzimas; o  
 el anticuerpo cargado sobre una partícula adecuado para separar mediante filtración o sedimentación; o  
 el anticuerpo a un título de al menos 1:5.000.

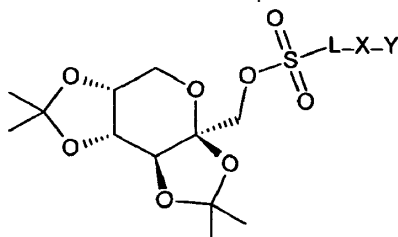
6. Un procedimiento de realizar un ensayo inmunodiagnóstico para detectar la presencia de topiramato en una muestra obtenida de un sujeto al que previamente se ha administrado topiramato, comprendiendo el procedimiento:

- 5 combinar un anticuerpo anti-topiramato y un análogo de topiramato con la muestra para formar una primera composición, en la que el anticuerpo anti-topiramato se produce contra una composición inmunogénica que incluye un inmunógeno que tiene una estructura de Fórmula I, en la que L-X-Y es  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{CO}-\text{R}$ , en donde R es uno de BSA o KLH;



Fórmula 1

- 10 dejar que cualquier topiramato libre de la muestra y el análogo de topiramato compita por la unión con el anticuerpo.  
detectar la unión entre el análogo de topiramato y el anticuerpo; y  
en donde el análogo de topiramato tiene una estructura química de Fórmula 1;



Fórmula 1

en la que:

- 20 L es uno del grupo  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}$ ,  $\text{NHCO}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{COO}$  o  $\text{O}$ ;  
X es al menos uno de un enlace entre L e Y, un grupo aromático o un grupo alifático; y  
Y se selecciona del grupo que consiste en alifático, alcohol, amina, amida, ácido carboxílico, aldehído, éster, éster activado, éster alifático, imidoéster, isocianato, isotiocianato, anhídrido, tiol, tiolactona, diazonio, maleimido, NHS, O-NHS y un enlazador derivado de los mismos acoplado a un grupo operativo.

- 25 7. Un procedimiento como en la reivindicación 6, en el que el grupo operativo se selecciona del grupo que consiste en proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, polipéptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, ácidos teicoicos, isótopos radiactivos, enzimas, fragmentos enzimáticos, fragmentos de donantes de enzima, fragmentos aceptores de enzimas, sustratos de enzimas, inhibidores de enzimas, coenzimas, restos fluorescentes, restos fosforescentes, restos de regulación por aumento anti-stokes, restos quimioluminiscentes, restos luminiscentes, colorantes, sensibilizantes, partículas, micropartículas, partículas magnéticas, soportes sólidos, liposomas, ligandos, receptores, isótopos radiactivos de hapteno y combinaciones de los mismos

- 35 8. Un procedimiento como en la reivindicación 6, que además comprende:  
obtener el análogo de topiramato y el anticuerpo, en donde uno del análogo de topiramato y el anticuerpo está acoplado con una micropartícula;  
irradiar la primera composición con luz incidente; y  
detectar una primera intensidad de la luz transmitida desde la primera composición.

- 40 9. Un procedimiento como en la reivindicación 8, que además comprende:  
identificar una intensidad mínima de luz transmitida desde una composición de unión control que tiene el análogo de topiramato y anticuerpo y que no tiene topiramato libre;  
comparar la intensidad mínima de la luz transmitida con la primera intensidad de la luz transmitida; y  
determinar si hay topiramato presente en la muestra, en donde si la intensidad mínima es diferente de la primera intensidad es una indicación de que hay topiramato presente en la muestra.

10. Un procedimiento como en la reivindicación 8, que además comprende:

5 combinar una cantidad conocida de topiramato con el análogo de topiramato y el anticuerpo para formar una composición de unión control;  
irradiar la composición de unión control con luz incidente;  
detectar una segunda intensidad de luz transmitida desde la composición de unión control; y  
determinar la cantidad de topiramato presente en la muestra, en donde una comparación entre la primera intensidad y la segunda intensidad es una indicación de la cantidad de topiramato presente en la muestra.

10 11. Un procedimiento como en la reivindicación 6, que además comprende:

15 obtener el análogo de topiramato, en el que el análogo de topiramato tiene un resto trazador;  
separar el anticuerpo de la primera composición;  
separar el análogo de topiramato no unido del anticuerpo; y  
detectar el resto trazador unido con el anticuerpo.

12. Un procedimiento como en la reivindicación 11, que además comprende:

20 combinar una cantidad conocida de topiramato con el análogo de topiramato y el anticuerpo para formar una composición de unión control;  
separar el anticuerpo de la primera composición de unión control;  
detectar una primera cantidad de resto trazador unido al anticuerpo desde la primera composición;  
detectar una segunda cantidad de resto trazador unido al anticuerpo desde la composición de unión control; y  
25 determinar la cantidad de topiramato presente en la muestra, en el que una comparación entre la primera cantidad de resto trazador y la segunda cantidad del resto trazador es una indicación de la cantidad de topiramato presente en la muestra.

13. Un procedimiento como en la reivindicación 11, en el que el anticuerpo está acoplado con una partícula.

30 14. Un procedimiento como en la reivindicación 13, en el que la partícula es una partícula magnética.

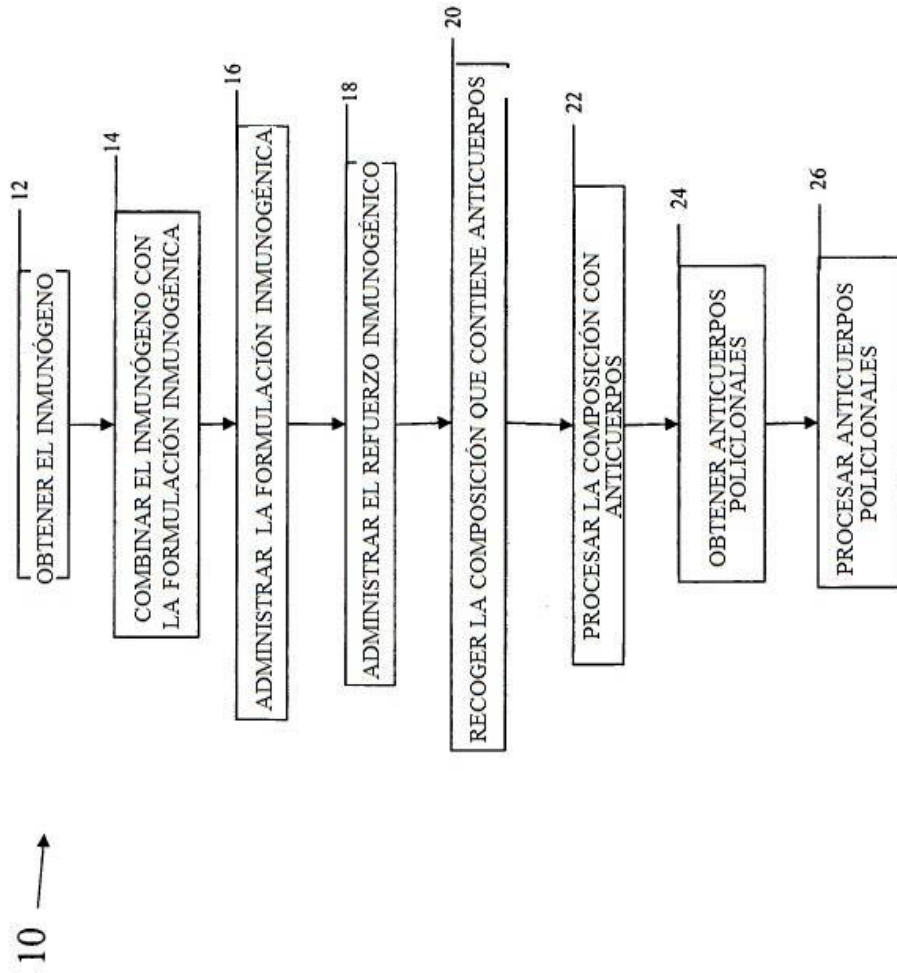


Fig. 1



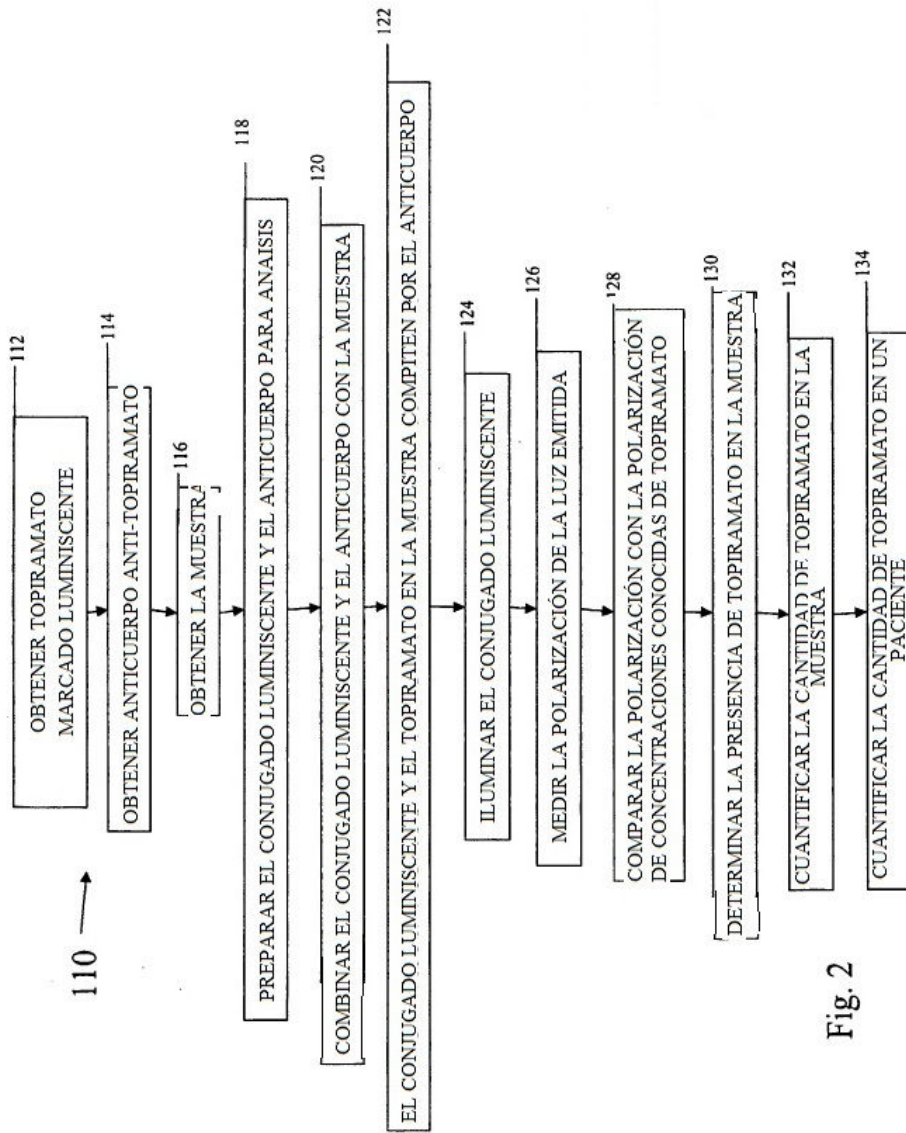


Fig. 2

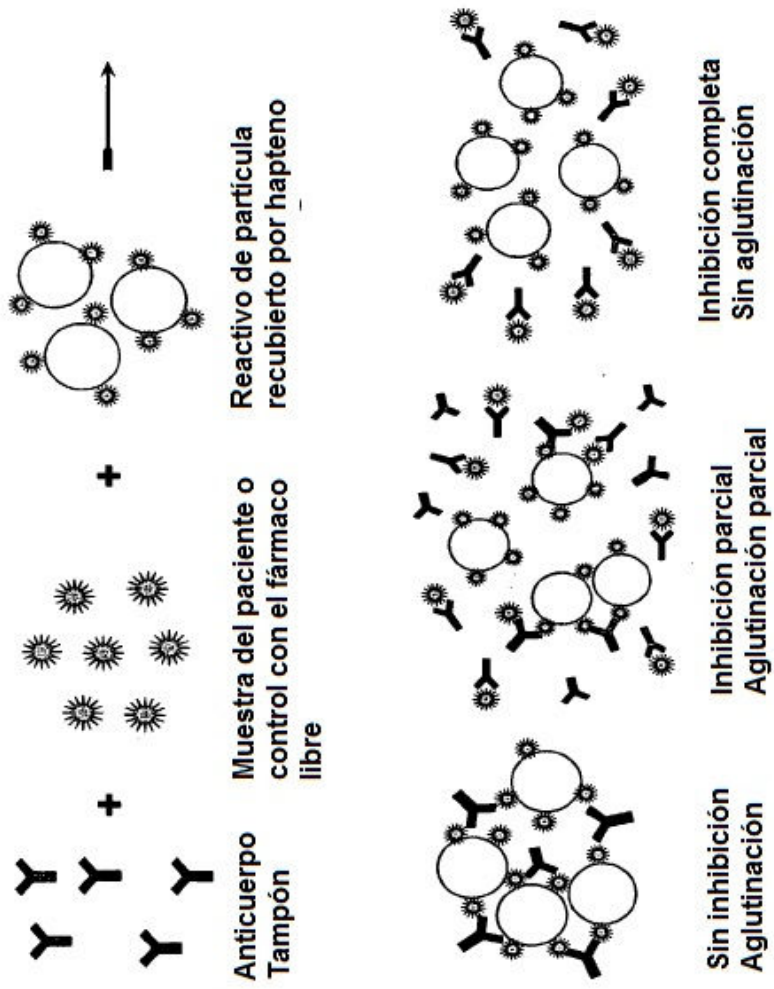


Fig. 3

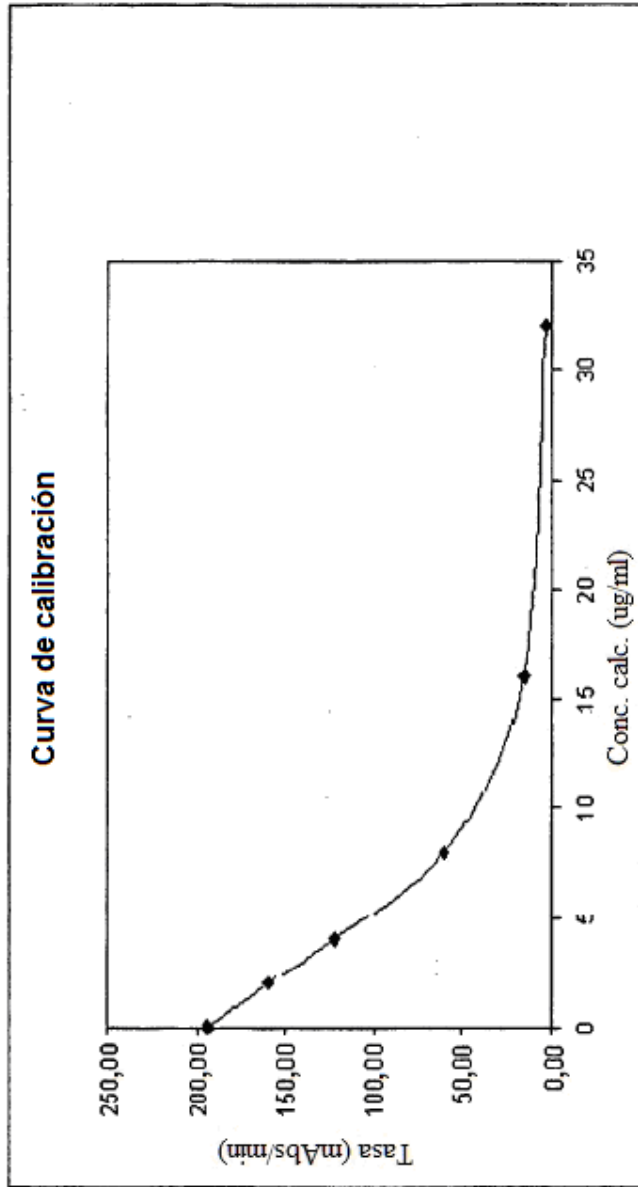


Fig. 4

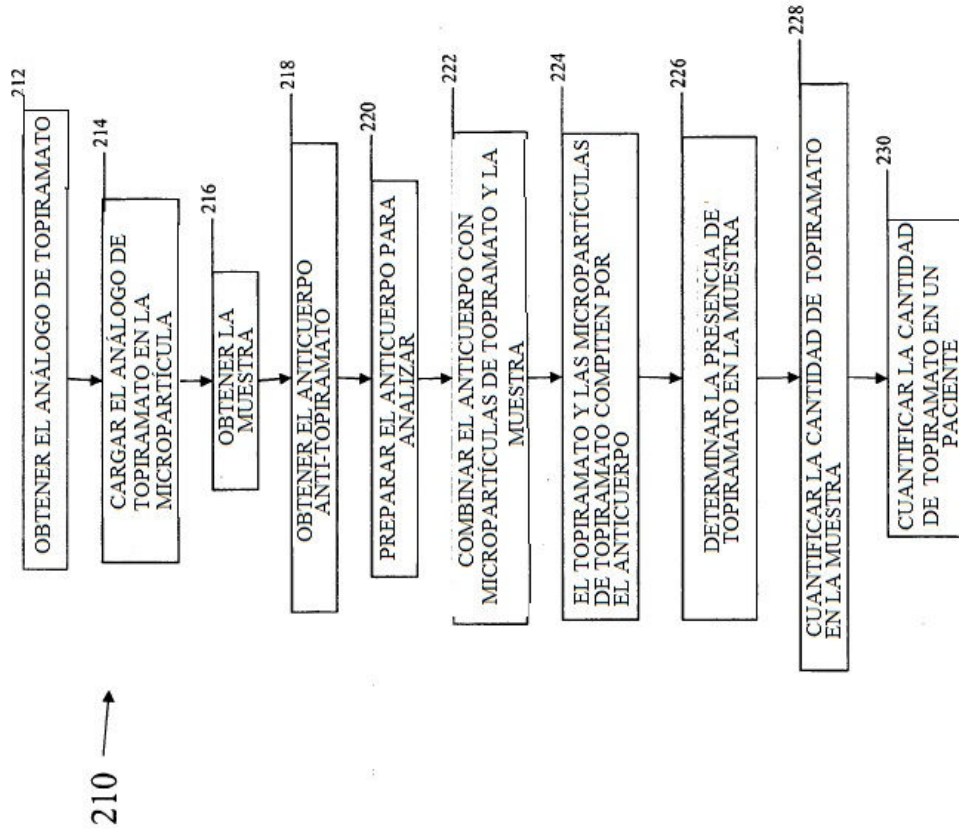


Fig. 5

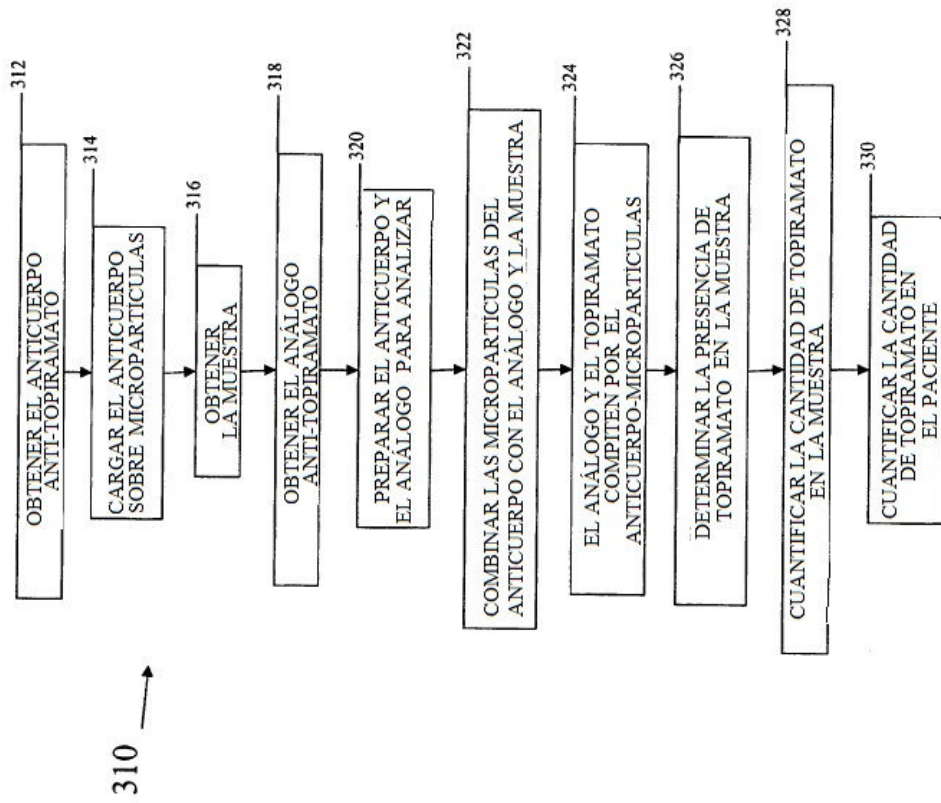


Fig. 6

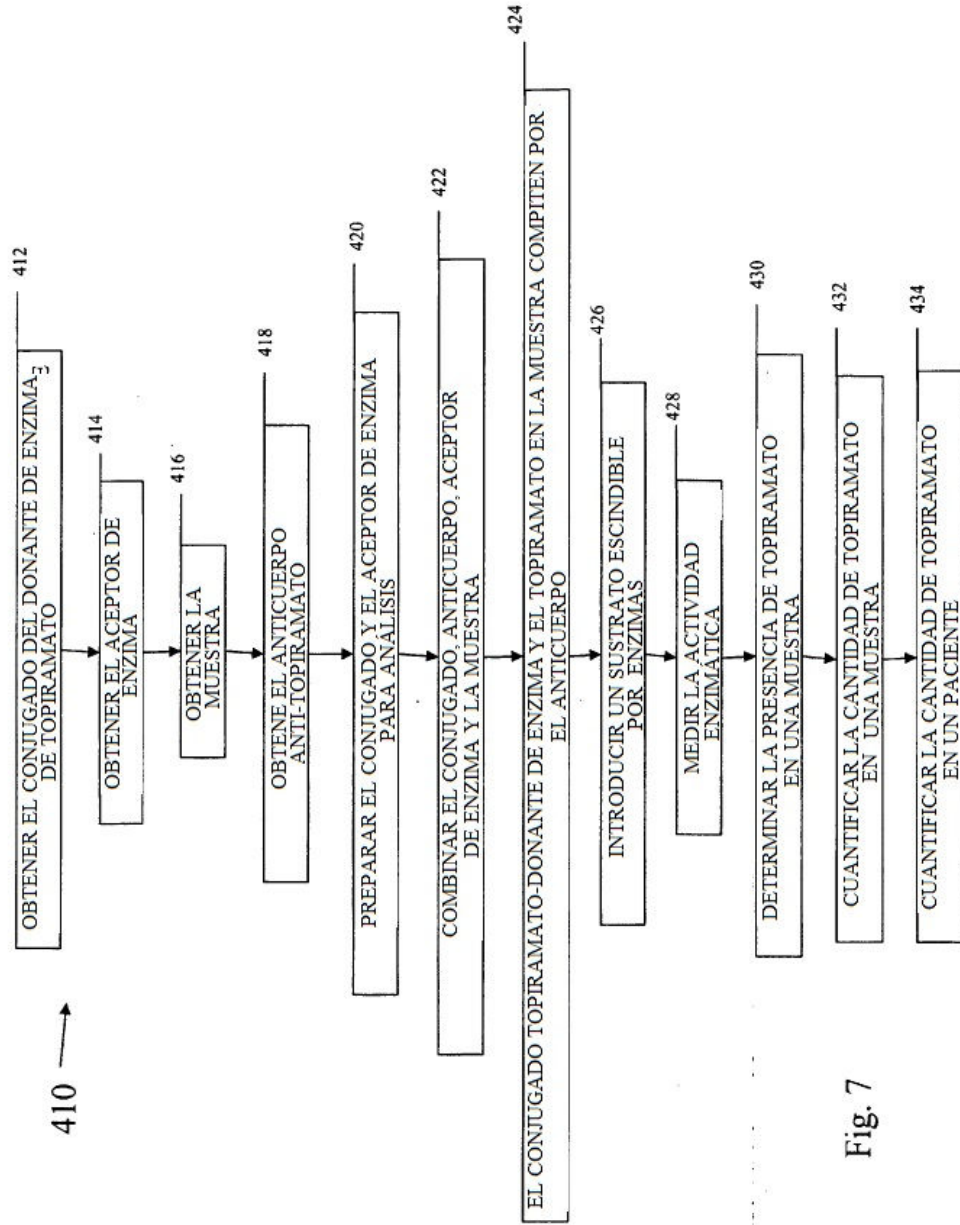


Fig. 7

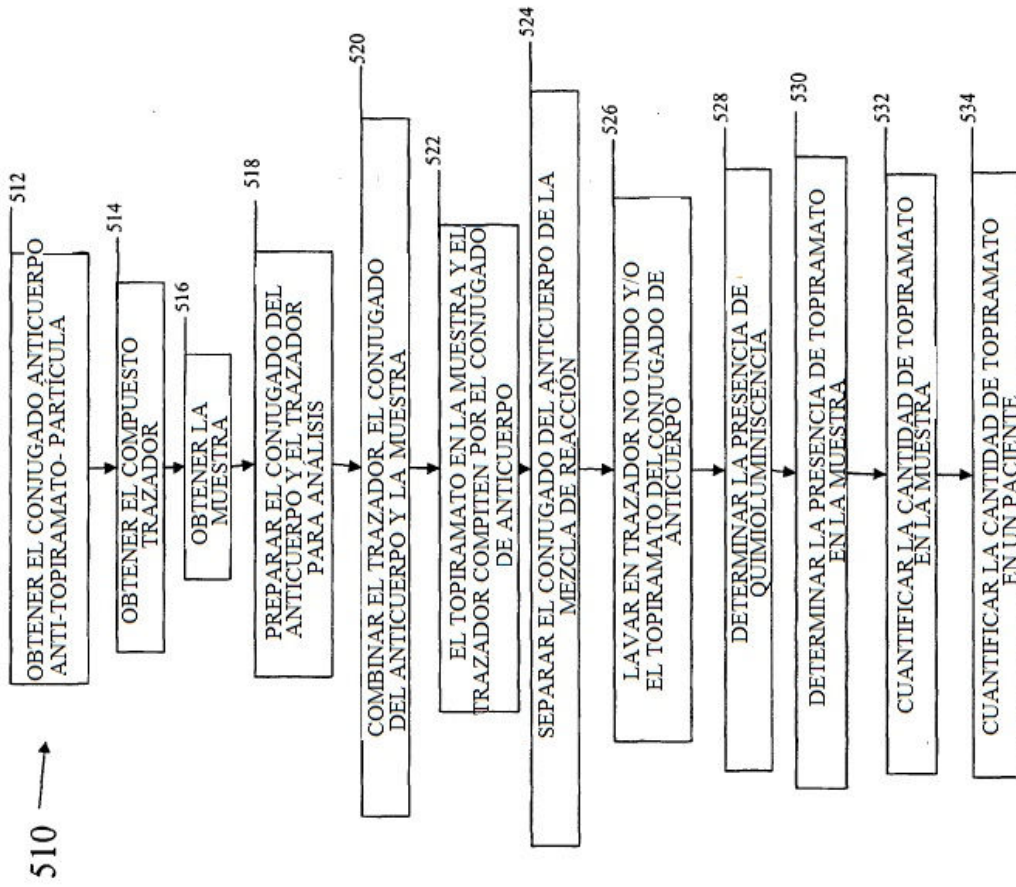


Fig. 8

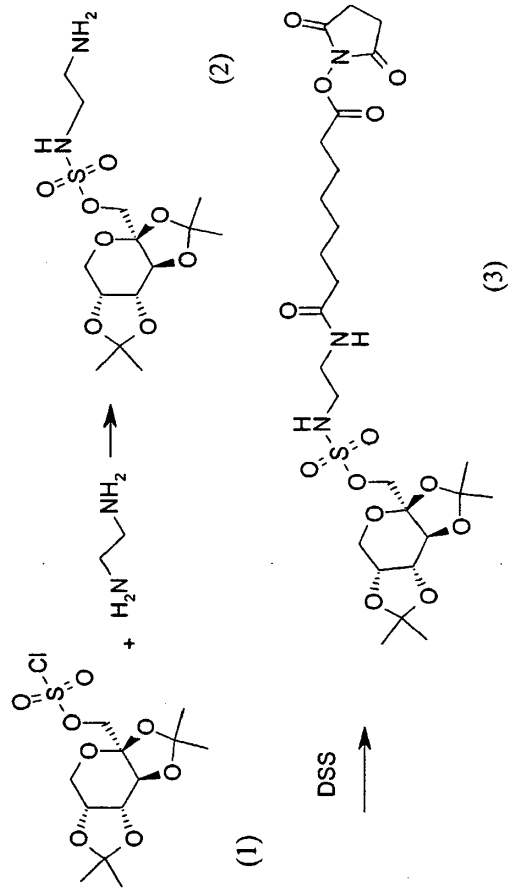
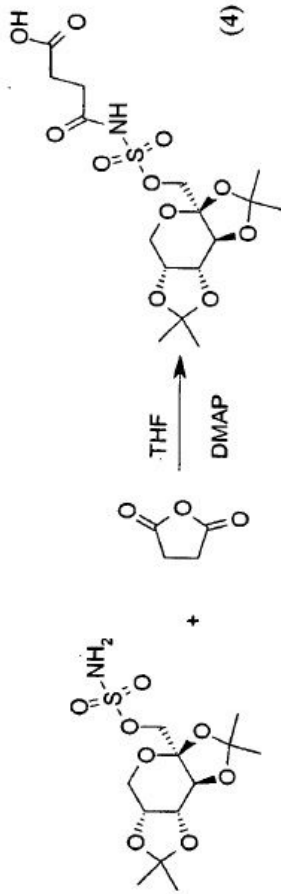


Fig. 9





(Tapiromato)

Fig. 10A

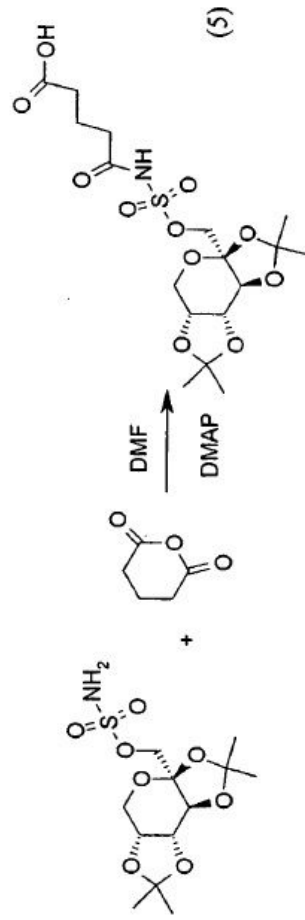


Fig. 10B

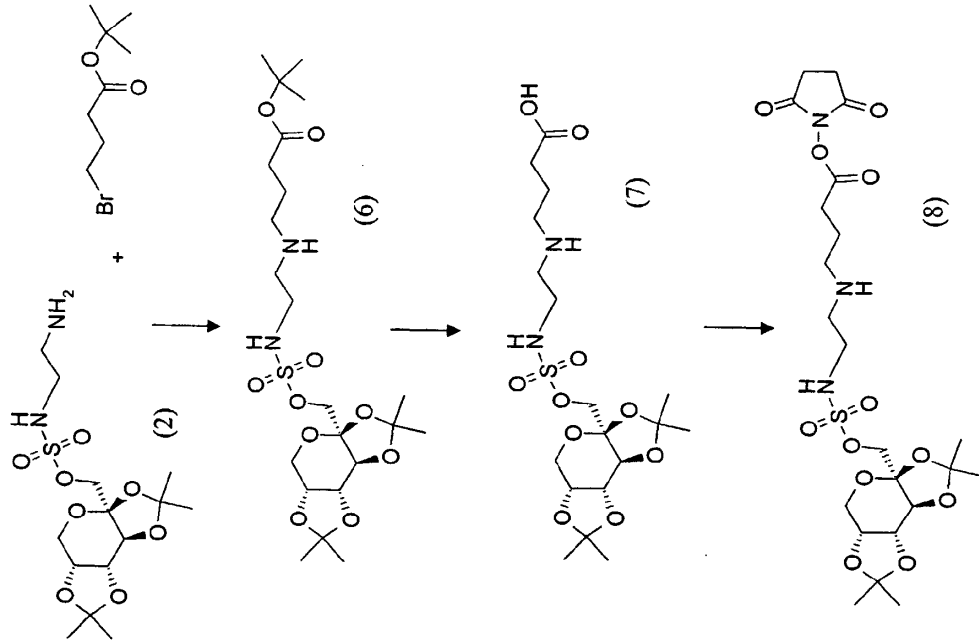


Fig. 11

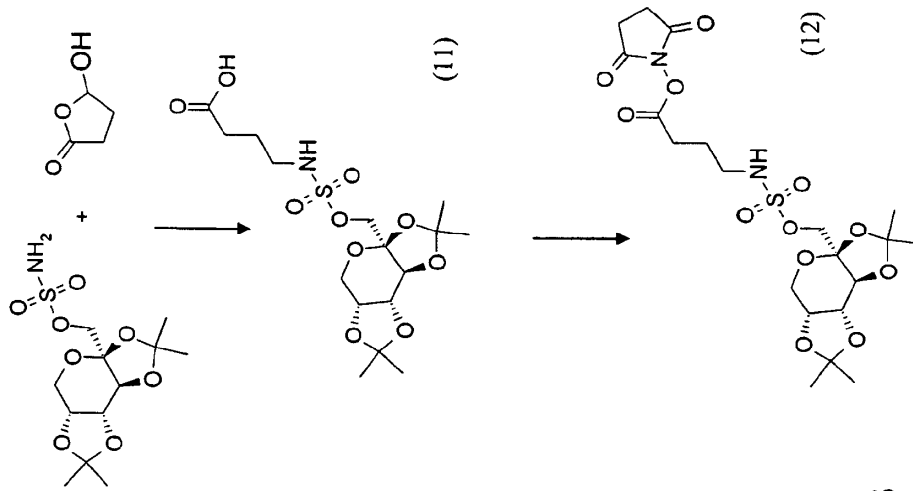


Fig. 13

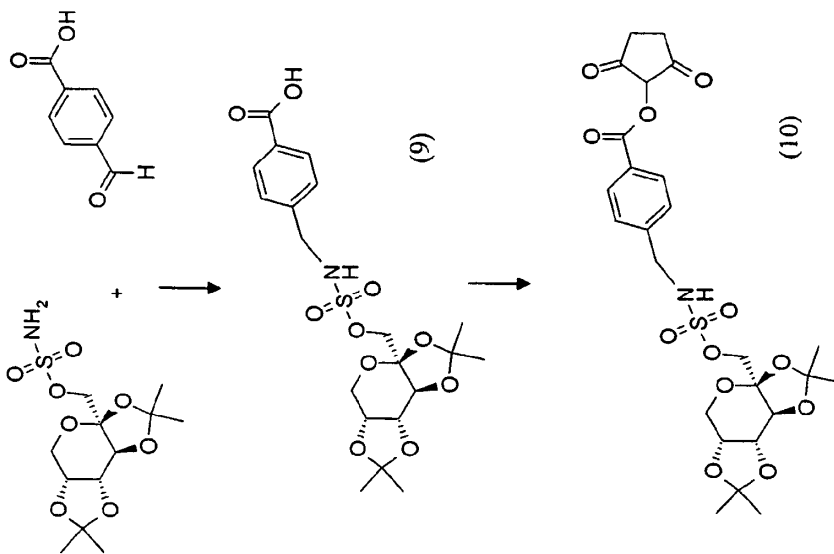


Fig. 12

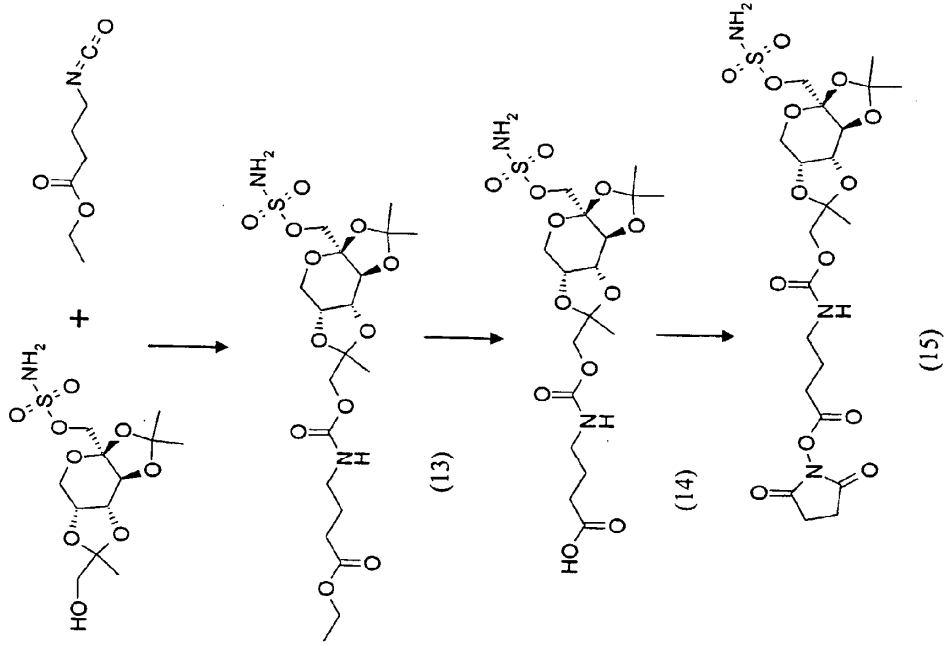


Fig. 14

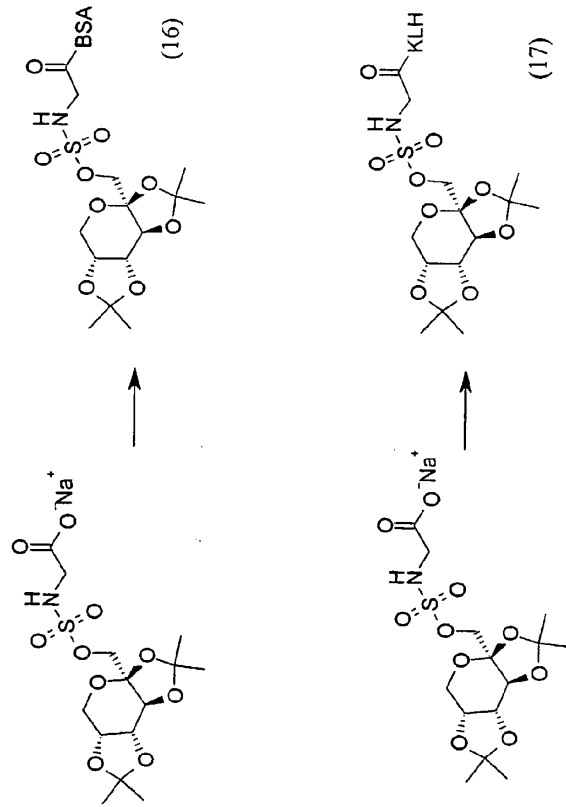


Fig. 15

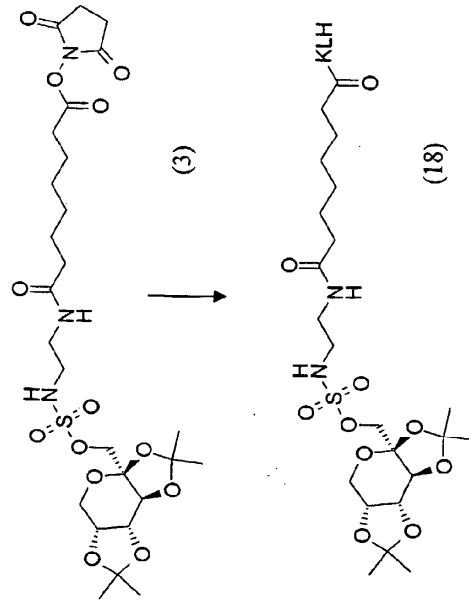


Fig. 16

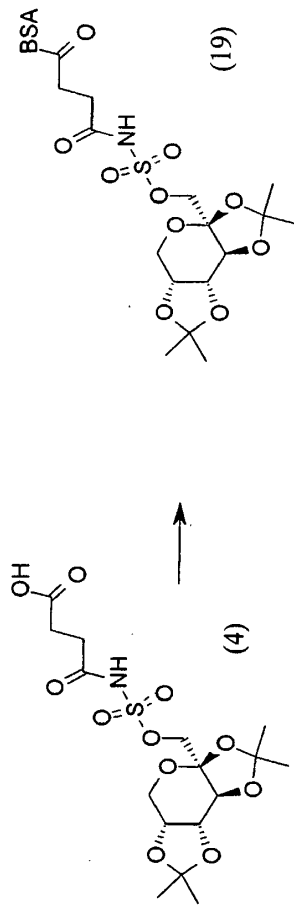


Fig. 17

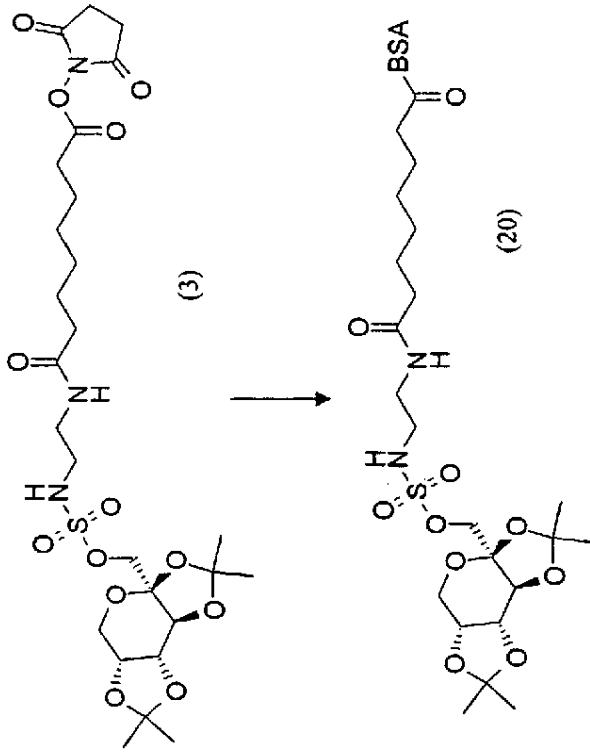


Fig. 18

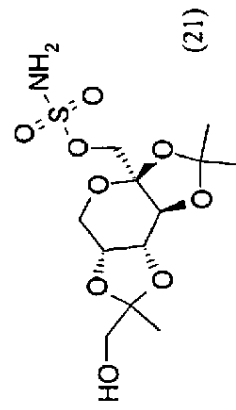


Fig. 19



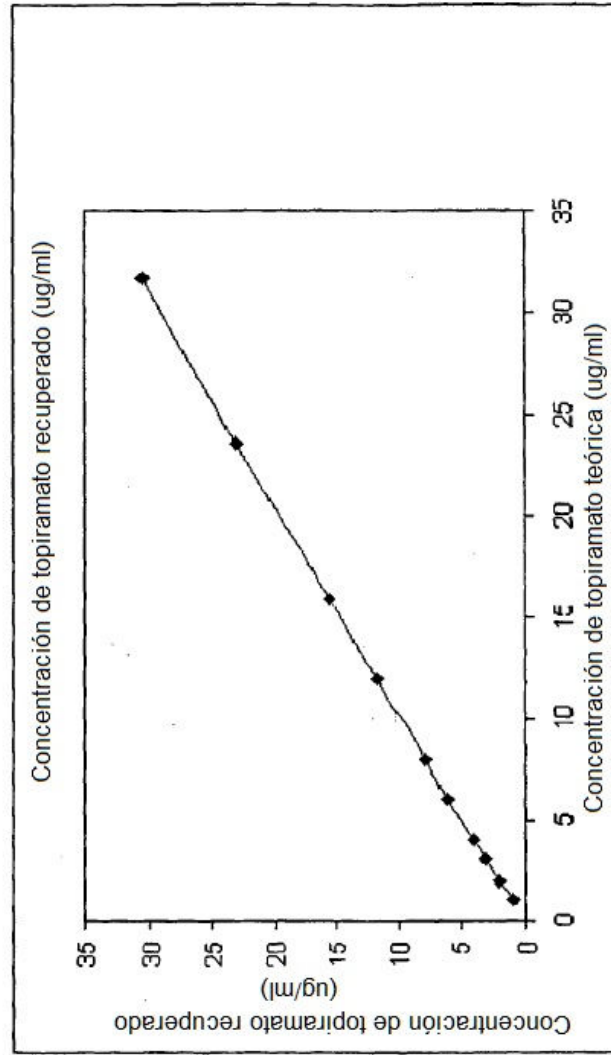


Fig. 20