

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 470**

51 Int. Cl.:

**C07D 223/26** (2006.01)

**C07D 223/28** (2006.01)

**C07D 491/044** (2006.01)

**G01N 33/532** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

**C07K 16/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12172190 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2535333**

54 Título: **Anticuerpos de unión de manera genérica con múltiples aplicaciones**

30 Prioridad:

**16.06.2011 GB 201110164**

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

**21.12.2015**

73 Titular/es:

**RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)  
Ardmore, 55 Diamond Road  
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB**

72 Inventor/es:

**BENCHIKH, ELOUARD;  
FITZGERALD, PETER;  
LOWRY, PHILIP y  
MCCONNELL, IVAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 554 470 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

Anticuerpos de unión de manera genérica con múltiples aplicaciones

5 **Antecedentes de la invención**

El fármaco carbamazepina (CBZ) se prescribe ampliamente para el tratamiento de diversos estados incluyendo trastorno por déficit de atención, trastorno bipolar, esquizofrenia y epilepsia. En los pacientes, CBZ tiene una semivida notificada de 18-65 horas y se metaboliza principalmente en 10,11-epóxido de carbamazepina (CBZ-E), 10,11-dihidro-10-hidroxicarbazepina (10-OH-CBZ), 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbazepina (10,11-diOH-CBZ) y en cantidades minoritarias de los glucurónidos correspondientes. El producto de excreción urinaria mayoritario es 10,11-diOH-CBZ (80%). Se notifica que el intervalo terapéutico es de 2-10 µg/ml para carbamazepina total, es decir libre y unida a proteína, y de 0,5-3,6 µg/ml para carbamazepina libre, siendo los valores tóxicos correspondientes mayores de 12,00 µg/ml y 4,00 µg/ml, respectivamente (Mayo Clinic, Mayo Medical Laboratories, 2011). Las concentraciones tóxicas pueden provocar somnolencia, cefaleas, afectar a la función motora y en casos extremos son mortales. Este índice terapéutico estrecho, junto con la variabilidad entre pacientes en la capacidad de respuesta al fármaco requiere que la concentración en sangre de CBZ y su principal metabolito activo, CBZ-E, se monitoricen en pacientes que siguen una terapia con CBZ. El inmunoensayo es un formato de prueba analítica común usado para la monitorización terapéutica de fármacos (*therapeutic drug monitoring*, TDM) de pacientes que toman fármacos tales como CBZ y se basa en anticuerpos que se unen al/a los analito(s) diana. Se describen varios inmunoensayos/componentes de inmunoensayo que se unen a carbamazepina y uno o más metabolitos a diversas concentraciones, por ejemplo los documentos EP1216994, US 5851779, EP0584854, EP0583820, US6803040. El documento US5821342 describe haptenos de carbamazepina e inmunógenos correspondientes derivados de una hidrazida de carbamazepina útiles en aplicaciones de inmunoensayo; la derivatización para formar el hapteno se produce a través del átomo de N terminal del grupo hidrazida. El documento US6368814 describe métodos de inmunoensayo para fármacos antidepresivos tricíclicos basados en anticuerpos/conjugados derivados de haptenos e inmunógenos de amitriptilina y desipramina. Están disponibles varios kits de inmunoensayo comerciales de especificidad variable, muchos de los cuales describen un uso de TDM para pacientes que siguen una terapia con carbamazepina (tabla 1). Parant *et al* (2000) describen la reactividad cruzada frente a CBZ-E, oxcarbazepina y 10-OH-CBZ de los inmunoensayos de carbamazepina automatizados PETINIA y EMIT 2000; el único reactante cruzado encontrado era CBZ-E en el ensayo PETINIA. Las aplicaciones de TDM basadas en inmunoensayos son las más idóneas debido a anticuerpos que tienen alta especificidad por o bien el fármaco original o bien un metabolito activo para permitir mediciones precisas de su concentración, mientras que las aplicaciones toxicológicas no tienen necesariamente este requisito de especificidad.

La oxcarbazepina es un fármaco antiepiléptico reciente que se metaboliza rápidamente en 10-OH-CBZ y se considera un candidato para TDM (Bring y Ensom 2008; Krasowski 2010). Podría usarse un anticuerpo que se une a oxcarbazepina/10-OH-CBZ en un inmunoensayo para monitorizar muestras *in vitro* de pacientes que están sometiéndose a terapia farmacológica con oxcarbazepina. Un anticuerpo de este tipo también podría aplicarse en un inmunoensayo para la TDM de otros fármacos de la familia de carbamazepina que producen 10-OH-CBZ como metabolito. Los inmunoensayos que incorporan tales anticuerpos podrían tener también otras aplicaciones, tales como en toxicología. Ninguno de los inmunoensayos descritos en la técnica anterior (incluyendo los ensayos comerciales descritos en la tabla 1) tienen reactividad cruzada sustancial hacia oxcarbazepina/10-OH-CBZ y, por tanto, no son adecuados para tales fines. Los perfiles de reactividad cruzada de los ensayos comerciales presentados en la tabla 1 sugieren que los inmunógenos usados para generar los anticuerpos de los ensayos se derivaron a través de derivatización en la carboxamida/posición 1 de un hapteno de carbamazepina/de tipo carbamazepina (molécula pequeña, preinmunógena). La extensión del consumo de productos farmacéuticos ha dado como resultado preocupaciones con respecto a los niveles de fármacos y sus metabolitos en el entorno acuático, uno de los cuales es carbamazepina. Es deseable la detección de medicamentos tales como carbamazepina en masas de agua potable y agua ambiental para determinar sus efectos ecotoxicológicos. Un inmunoensayo de CBZ descrito recientemente que incorpora un anticuerpo monoclonal detectó CBZ y CBZ-E pero tenía reactividad cruzada insignificante hacia oxcarbazepina, 10-OH-CBZ y 10,11-di-OH-CBZ (Bahlmann *et al*. 2009). Es probable que la cantidad de carbamazepina en masas de agua se subestimase por este inmunoensayo ya que el anticuerpo mostraba una unión insignificante al metabolito urinario mayoritario de carbamazepina, 10,11-di-OH-CBZ. Los anticuerpos de inmunoensayos de carbamazepina actuales no reaccionan de manera cruzada con 10,11-di-OH-CBZ y, por tanto, subestimarian los niveles del fármaco carbamazepina en el entorno acuático. Un inmunoensayo preferido encontraría aplicación en la TDM de carbamazepina, de fármacos basados en carbamazepina más nuevos y para la monitorización de fármacos basados en carbamazepina en el entorno. Es evidente que los inmunoensayos actuales, en los que los anticuerpos de ensayo tienen alta afinidad con CBZ y CBZ-E, no presentan esta amplia aplicabilidad.

**Bibliografía**

- Bring P. y Ensom M.H.H. 2008. Clin. Pharmac., 47: 767-778.
- 65 Bahlmann A. *et al*. 2009. Anal. Bioanal. Chem., 395: 1809-1820.

Krasowski M.D. 2010. Pharmaceuticals, 3: 1909-1935.

Mayo Clinic, [http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/print.php?unit\\_code=81770](http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/print.php?unit_code=81770), el 25 de marzo de 2011.

Parant *et al.* (2003). Ther. Drug Monit., 25: 41-45.

**Dibujos**

Figura 1. Estructuras de carbamazepina y metabolitos mayoritarios.

Figura 2. Preparación de haptenos A y B.

Tabla 1. Inmunoensayos de carbamazepina disponibles comercialmente\*

Proveedor	Analizador/método	Reactividad cruzada
Abbott Diagnostics	AxSYM	CBZ-E ≤ 83,0%
		Desipramina ≤ 540,0%
Roche Diagnostics	TDM en línea**	CBZ-E 14,0%
		10-OH-CBZ 1,2%
		Oxcarbazepina 1,0%
Siemens	ADVIA	CBZ-E 21,8%
		Amitriptilina 5,2%
		Nortriptilina 5,2%
Beckman Coulter (BC)	Analizadores de BC	CBZ-E 7,4%
		Amitriptilina 18,6%
		Nortriptilina 17,2%
		Fenotiazina 8,6%
		Imipramina 5,6%
		Diazepam 4,8%

\* Datos tomados de las fichas técnicas de los fabricantes o FDA 512(k)

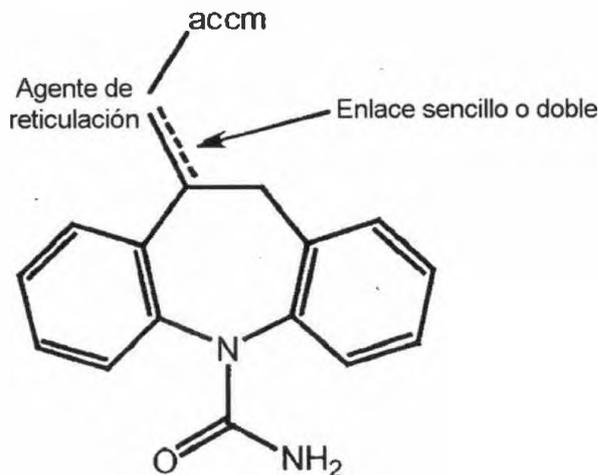
\*\* A 6 µg/ml de carbamazepina

**Sumario de la invención**

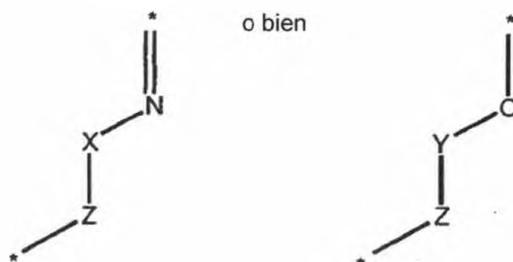
La invención describe inmunógenos usados en la producción de anticuerpos policlonales novedosos con propiedades de unión únicas que superan las limitaciones de aplicación de inmunoensayos descritos actualmente permitiendo métodos y kits para la detección y cuantificación de oxcarbazepina/10,11-dihidro-10-hidroxicarbazepina en muestras de pacientes *in vitro* y pruebas de inmunoensayo de entornos acuáticos más precisas del nivel de fármacos de la familia de carbamazepina, incluyendo 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbazepina. Además, la reactividad cruzada genérica de los anticuerpos permite que se efectúe un inmunoensayo de carbamazepina/10,11-epóxido de carbamazepina convencional.

**Descripción detallada de la invención**

La invención proporciona un inmunógeno de estructura



en la que el agente de reticulación es preferiblemente



5 en los que X es un grupo alquilo, alquileno o arileno sustituido o no sustituido o un oxígeno unido a un grupo alquilo, alquileno o arileno sustituido o no sustituido e Y es un grupo alquilo, alquileno o arileno sustituido o no sustituido; los grupos alquilo o alquileno de X e Y son preferiblemente C<sub>1-10</sub>, lo más preferiblemente C<sub>1-6</sub>; Z es o bien carbonilo o bien amino y se une al accm. El agente de reticulación preferido es cuando X es -O-CH<sub>2</sub>- y Z es carbonilo, uniéndose el grupo metileno de X a Z. En el campo del desarrollo de anticuerpos, se considera generalmente que la longitud óptima del grupo de unión que une el analito que va a detectarse al accm (longitud de cadena lineal y sin incluir átomos de hidrógeno) es de aproximadamente 1-10 átomos, más habitualmente de aproximadamente 1-6 átomos. Para el fin de la invención, el agente de reticulación es la cadena de átomos que une la posición 10 del anillo tricíclico al accm. El accm es un material portador que confiere antigenicidad y es cualquier material que haga que la totalidad o parte de la fracción carbamazepina sea susceptible al reconocimiento y la unión por el anticuerpo. Por ejemplo, el accm puede ser una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. El accm es preferiblemente tiroglobulina bovina (BTG).

10 La invención también describe anticuerpos sensibles con reactividad cruzada genérica novedosa que permiten por primera vez una utilidad de múltiples aplicaciones, es decir, que van a usarse en TDM, toxicología y detección ambiental.

15 Por tanto, otro aspecto de la invención son anticuerpos que se unen a un epitopo de carbamazepina, 10,11-epóxido de carbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, oxcarbazepina y 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina caracterizados porque tienen sensibilidad suficiente como para usarse en aplicaciones toxicológicas y ambientales. La capacidad de los anticuerpos para reconocer CBZ y CBZ-E permite una prueba de TDM para pacientes que siguen una terapia con CBZ; el reconocimiento de oxcarbazepina y 10-OH-CBZ permite una prueba de TDM para pacientes que toman oxcarbazepina; el reconocimiento de 10,11-di-OH-CBZ permite un kit de monitorización de entornos acuáticos; además, la alta sensibilidad de los anticuerpos con respecto a oxcarbazepina, CBZ y 10-OH-CBZ permite el uso de los anticuerpos en aplicaciones toxicológicas. El experto es consciente de que la reactividad cruzada genérica de anticuerpos no proporciona necesariamente un anticuerpo apropiado para aplicación industrial a menos que la sensibilidad asociada esté dentro de un intervalo que puede ser de uso práctico. Una medida común de la sensibilidad de anticuerpos para inmunoensayos es la CI<sub>50</sub>. También se reconoce que para inmunoensayos que utilizan un formato de competencia, el valor de CI<sub>50</sub> exacto varía ligeramente dependiendo de la naturaleza del conjugado usado para competir con el analito en la muestra.

20 Un aspecto adicional de la invención son anticuerpos que tienen una CI<sub>50</sub> de aproximadamente 2 ng/ml para carbamazepina, de aproximadamente 3 ng/ml para 10,11-epóxido de carbamazepina, de aproximadamente 3 ng/ml para 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, de aproximadamente 1 ng/ml para oxcarbazepina y de aproximadamente 15 ng/ml para 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina.

25 Un aspecto todavía adicional de la invención son anticuerpos que tienen una CI<sub>50</sub> de al menos 2,135 ng/ml para carbamazepina, de al menos 3,125 ng/ml para 10,11-epóxido de carbamazepina, de al menos 3,167 ng/ml para 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, de al menos 0,714 ng/ml para oxcarbazepina y de al menos 15,269 ng/ml para 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina. El experto en la técnica sabe que, variando la concentración de anticuerpo a través de dilución, pueden ajustarse los valores de CI<sub>50</sub> dependiendo de la aplicación. Tal como se estableció anteriormente, la TDM de CBZ se implementa generalmente a una concentración de µg/ml.

30 Otro aspecto de la invención son los anticuerpos descritos anteriormente generados a partir de uno o más de los inmunógenos descritos anteriormente.

35 Los anticuerpos de la invención son preferiblemente policlonales, pero pueden ser derivados modificados por ingeniería genética y/o de manera sintética tales como anticuerpos monoclonales o fragmentos variables de cadena sencilla (scFv).

40 La invención también proporciona métodos de detección o determinación de uno o más de carbamazepina, 10,11-epóxido de carbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, oxcarbazepina y 10,11-dihidro-10,11-

dihidroxycarbamazepina en una muestra *in vitro* de un individuo o una muestra ambiental que comprende: poner en contacto la muestra con uno o más agentes de detección y uno o más anticuerpos de la invención; detectar, o determinar la cantidad de, el uno o más agentes de detección; y deducir a partir de calibradores la presencia de o la cantidad de uno o más de carbamazepina, 10,11-epóxido de carbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroxycarbamazepina, oxcarbazepina y 10,11-dihidro-10,11-dihidroxycarbamazepina en la muestra.

"Detectar" significa analizar cualitativamente la presencia o ausencia de una sustancia, "determinar" significa analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia. El agente de detección es una molécula pequeña (generalmente de estructura similar a una molécula que va a detectarse), conjugada con un agente de marcaje, que puede unirse a uno de los anticuerpos de la invención. El agente de marcaje se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radiactiva, o una mezcla de las mismas. Preferiblemente, el agente de marcaje es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, lo más preferiblemente peroxidasa del rábano (HRP). Alternativa o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente. Para los fines de la invención, la muestra del paciente que va a usarse para análisis *in vitro* puede ser cabello o un líquido biológico periférico pero es preferiblemente sangre completa, suero, plasma u orina. Si la historia de la muestra se desconoce, por ejemplo si es una muestra de sangre u orina tomada de un paciente inconsciente, el método será semicuantitativo, es decir podrían detectarse varias moléculas y cuantificarse una cantidad "equivalente normalizada". Si la historia de la muestra se conoce, por ejemplo si es una muestra de orina de un individuo que sigue una terapia con oxcarbazepina, el método puede clasificarse como esencialmente cuantitativo ya que se detectará 10-OH-CBZ, representando la molécula original sin cambios menos del 1% del producto excretado.

Un aspecto adicional de la invención es un kit para detectar o determinar uno o más de carbamazepina, 10,11-epóxido de carbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroxycarbamazepina, oxcarbazepina y 10,11-dihidro-10,11-dihidroxycarbamazepina, que comprende uno o más anticuerpos de la invención. Opcionalmente, los kits pueden contener uno o más agentes de detección y uno o más calibradores.

Pueden usarse anticuerpos, métodos y kits de la invención en diversas aplicaciones tales como TDM, toxicología y para la monitorización ambiental más precisa de estos fármacos.

### **Métodos generales, ejemplos y resultados**

#### Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

Aunque las moléculas pequeñas diana proporcionan epítopos estructurales, no son por sí mismas inmunógenas y, por tanto, es necesario conjugadas con materiales portadores, lo que provocará una respuesta inmunogénica cuando se administran a un animal huésped. Los materiales portadores apropiados contienen comúnmente segmentos de poli(aminoácidos) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteína. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son albúmina sérica bovina (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KLH), etc. Alternativamente, pueden emplearse poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, como también otros materiales poliméricos sintéticos o naturales que portan grupos funcionales reactivos. Además, pueden conjugarse hidratos de carbono, levaduras o polisacáridos con el hapteno para producir un inmunógeno. Los haptenos también pueden acoplarse con un agente de marcaje detectable tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa del rábano), una sustancia que tenga propiedades fluorescentes o un marcador radiactivo para la preparación de agentes de detección para su uso en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado del mismo. La formación de inmunógenos para la invención descrita en el presente documento implica química de conjugación convencional. Con el fin de confirmar que se ha logrado una conjugación adecuada del hapteno con el material portador, antes de la inmunización, cada inmunógeno se evalúa usando espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser UV asistida por matriz (EM MALDI-TOF).

#### Procedimiento general para el análisis por MALDI-TOF de inmunógenos.

Se realizó espectrometría de masas MALDI-TOF usando un espectrómetro de masas de desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Se diluyó una alícuota de cada muestra que iba a analizarse en ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1% para crear disoluciones de muestra de 1 mg/ml. Se analizaron alícuotas (1 µl) usando una matriz de ácido sinapínico y albúmina sérica bovina (Fluka) como calibrante externo.

#### Preparación de antisueros

Con el fin de generar antisueros policlonales, se mezcla un inmunógeno de la presente invención con adyuvante de Freund y se inyecta la mezcla en un animal huésped, tal como conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. Las ovejas son el animal huésped preferido. Se realizan inyecciones adicionales (refuerzos) y se toman muestras de suero para la evaluación del título de anticuerpos. Cuando se ha alcanzado el título óptimo, se extrae sangre del animal huésped para producir un volumen adecuado de suero específico. El grado de purificación de anticuerpos

requerido depende de la aplicación prevista. Para muchos fines, no hay ningún requisito para la purificación; sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo va a inmovilizarse sobre un soporte sólido, pueden adoptarse etapas de purificación para retirar material no deseado y eliminar la unión no específica.

## 5 Desarrollo del inmunoensayo

El procedimiento de desarrollo de un inmunoensayo lo conoce bien el experto en la técnica. En resumen, para un inmunoensayo de competencia en el que el analito diana es una molécula no inmunógena tal como un hapteno, se realiza el siguiente procedimiento: se producen anticuerpos inmunizando un animal, preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno. El suero del animal inmunizado se recoge cuando el título de anticuerpos es suficientemente alto. Se añade un agente de detección a una muestra que contiene el analito diana y los anticuerpos generados, y el agente de detección y el analito compiten por la unión a los anticuerpos. El procedimiento puede comprender fijar dichos anticuerpos séricos a un sustrato de apoyo tal como un soporte sólido de poliestireno o un chip de cerámica. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales usando técnicas convencionales. La señal emitida en el inmunoensayo es proporcional a la cantidad de agente de detección unido a los anticuerpos, que a su vez es inversamente proporcional a la concentración de analito. La señal puede detectarse o cuantificarse mediante comparación con un calibrador.

### Ejemplos

#### 20 Ejemplo 1: Síntesis de 7-carboximetiloxima de oxcarbazepina 2 (hapteno A)

A una disolución de oxcarbazepina 1 (2,52 g, 10 mM) en piridina seca (50 ml) bajo nitrógeno se le añadió hemicleorhidrato de carboximetoxilamina (1,31 g, 12 mM) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla era turbia al principio pero se volvió de color amarillo transparente tras unas pocas horas. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando el 10% de metanol / el 90% de cloroformo para dar 2,3 g del producto como una espuma. Entonces se trituró el producto con acetato de etilo / hexano (1/1), se filtró el sólido blanco formado y se secó para dar 2 g de 7-carboximetiloxima de oxcarbazepina 2 (hapteno A). P.F. 205 °C (desc). <sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) (δ: ppm): 171,21, 156,17, 154,49, 143,45, 141,16, 134,25, 130,77, 130,66, 130,57, 129,70, 128,64, 128,58, 128,31, 128,06, 127,6, 71,09 y 32,17.

#### 35 Ejemplo 2: Síntesis de tiolactona de homocisteína de 7-carboximetiloxima de oxcarbazepina 3 (hapteno B)

A una disolución bajo nitrógeno de 7-carboximetiloxima de oxcarbazepina 2 (hapteno A) (1 g, 3,07 mM) en piridina seca (25 ml) se le añadió clorhidrato de tiolactona de homocisteína (568 mg, 3,7 mM) y clorhidrato de EDC (710 mg, 3,7 mM) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente; la CCF indicó que se completó la reacción. Se eliminó la piridina a vacío y se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando el 15% de metanol / el 85% de cloroformo para proporcionar 885 mg de la tiolactona de homocisteína de 7-carboximetiloxima de oxcarbazepina 3 pura (hapteno B) como un sólido espumoso blanquecino.

<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) (δ: ppm): 205,53, 170,56, 156,62, 142,55, 131,37, 131,19, 130,88, 129,33, 129,11, 128,42, 73,81, 60,78, 59,44, 32,10, 28,91, 21,43.

#### 45 Ejemplo 3: Conjugación del hapteno A con BSA (inmunógeno I)

A una disolución de 7-carboximetiloxima de oxcarbazepina 2 (hapteno A) (38,73 mg, 0,112 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (25,35 mg, 0,123 mmol) y N-hidroxisuccinimida (14,13 mg, 0,123 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró la diciclohexilurea formada mediante filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BSA (150 mg, 2,3 μmol) en disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4 °C. Entonces se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se secó por congelación. Los resultados de MALDI mostraron que se habían conjugado 24,99 moléculas de hapteno A con una molécula de BSA.

#### 55 Ejemplo 4: Conjugación del hapteno A con BTG (inmunógeno II)

A una disolución de 7-carboximetiloxima de oxcarbazepina 2 (hapteno A) (43,91 mg, 0,135 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (30,7 mg, 0,149 mmol) y N-hidroxisuccinimida (17,13 mg, 0,149 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró la diciclohexilurea formada mediante filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BTG (150 mg) en disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4 °C. Entonces se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se secó por congelación.

#### 65 Ejemplo 5: Conjugación del hapteno A con HRP

Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una disolución de 7-carboximetiloxima de oxcarbazepina 2 (hapteno A) (2 mg) en DMF (0,2 ml). Tras mezclar, se añadió esta disolución gota a gota a una disolución de HRP (20 mg) en agua (1 ml). Se añadió sulfo-NHS (5 mg) y se incubó la mezcla de reacción en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el hapteno en exceso con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS a pH 7,2. Entonces se dializó el conjugado de hapteno-HRP durante la noche frente a 10 l de PBS a pH 7,2 a 4 °C.

#### Ejemplo 6: Coniugación del hapteno B con HRP modificada con maleimida

Se disolvió el hapteno B (2 mg) en una mezcla de DMF/agua (100 µl) y a esta disolución se le añadió hidróxido de potasio (2 M) (10 µl). Se permitió que la mezcla estuviera en reposo durante 10 minutos. Se añadió tampón fosfato (100 µl) para extinguir la reacción y se ajustó el pH a 7 mediante la adición de HCl 0,1 M. Se añadió esta disolución gota a gota a HRP modificada con maleimida (20 mg) disuelta en tampón fosfato (1 ml) y se agitó la disolución a 4 °C durante la noche (protegida de la luz). Se retiró el hapteno en exceso con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS a pH 7,2. Entonces se dializó el conjugado de hapteno-HRP con 10 l de PBS a pH 7,2 a 4 °C.

#### Ejemplo 7: Desarrollo de un ELISA de competencia

Se conjugó carbamazepina con tiroglobulina bovina (BTG). Se administró el inmunógeno resultante a ovejas adultas mensualmente para proporcionar antiseros policlonales específicos de diana. Se extrajo IgG de los antiseros por medio de precipitación de inmunoglobulina con sulfato de amonio/ácido caprílico. Se recubrió una placa de microtitulación (Thermo Fisher Scientific NUNC, 468667) con anticuerpo (125 µl/pocillo) en tampón de recubrimiento (Tris 10 mM pH 8,5) a 37 °C durante 2 horas. Entonces se lavó la placa 4 veces a lo largo de 10 minutos con TBST a concentración de trabajo. Se añadieron 50 µl de muestra/patrón (carbamazepina, Sigma C4024; 10,11-epóxido de carbamazepina, TRC C175850; 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, TRC D449135; rac-trans-10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina, TRC D449040; oxcarbazepina, TRC 0869250; imipramina, Sigma 17379 y amitriptilina, Sigma A8404) a los pocillos apropiados por triplicado, seguido por 75 µl de conjugado de hapteno-HRP y se incubó a 25 °C durante 1 hora. Entonces se lavó la placa y se añadieron 125 µl de TMB (Randox, 4380-15) a cada pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min en la oscuridad. Se detuvo la reacción usando 125 µl de ácido sulfúrico 0,2 M. Se leyeron las absorbancias a 450 nm con un lector de microplacas de ELISA (BIO-TEK Instruments, Elx800) y se calcularon las medias. Entonces se determinaron la especificidad y sensibilidad de los anticuerpos.

#### Resultados

Empleando cada serie de patrones, se generaron curvas de calibración y se usaron éstas para determinar la especificidad del inmunoensayo para la carbamazepina, oxcarbazepina, metabolitos y moléculas relacionadas estructuralmente. Los resultados de este estudio se presentan en la tabla 2, calculándose la reactividad cruzada según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de RC} = \text{Cl}_{50, \text{ carbamazepina}} / \text{Cl}_{50, \text{ RC}} \times 100$$

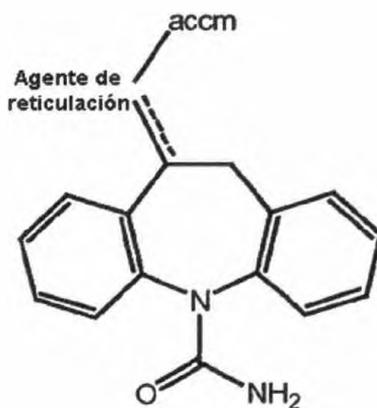
en la que % de RC es el porcentaje de reactividad cruzada,  $\text{Cl}_{50, \text{ carbamazepina}}$  es la concentración de carbamazepina que provoca un desplazamiento del 50% de la señal y  $\text{Cl}_{50, \text{ RC}}$  es la concentración de carbamazepina/metabolitos/moléculas relacionadas estructuralmente que provoca un desplazamiento del 50% de la señal. Los resultados muestran un anticuerpo de alta sensibilidad de molécula individual y reactividad cruzada genérica, lo que permite que se use en una gama diversa de aplicaciones.

Tabla 2. Caracterización de anticuerpos usando antisuero generado frente al inmunógeno II y agente de detección derivado del hapteno A en una forma de ensayo de competencia (RC basada en el 100% para carbamazepina)

Analito	$\text{Cl}_{50}$ ng/ml	% de reactividad cruzada
CBZ	2,135	100,00
CBZ-E	3,125	68,30
10-OH-CBZ	3,167	67,40
10,11-diOH-CBZ	15,269	14,00
Oxcarbazepina	0,714	299,00
Amitriptilina	>>200	<<1,10
Imipramina	>>200	<<1,10

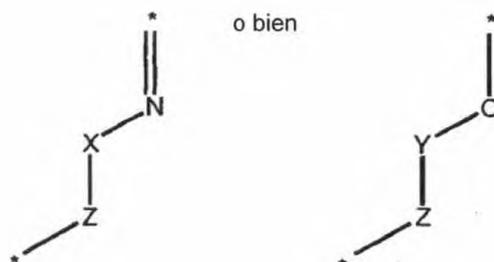
REIVINDICACIONES

1. Inmunógeno de estructura



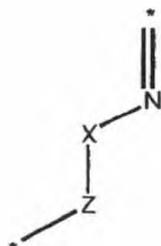
en la que el accm es un material portador que confiere antigenicidad.

2. Inmunógeno según la reivindicación 1, en el que el agente de reticulación es



en los que X es un grupo alquilo, alquileno o arileno sustituido o no sustituido o un oxígeno unido a un grupo alquilo, alquileno o arileno sustituido o no sustituido e Y es un grupo alquilo, alquileno o arileno sustituido o no sustituido, en los que los grupos alquilo o alquileno de X e Y son preferiblemente C<sub>1-10</sub>, lo más preferiblemente C<sub>2-6</sub>; Z es o bien carbonilo o bien amino y se une al accm.

3. Inmunógeno según la reivindicación 2, en el que el agente de reticulación es



en el que X es -O-CH<sub>2</sub>- y Z es carbonilo.

4. Anticuerpos que se unen a un epítipo de carbamazepina, 10,11-epóxido de carbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, oxcarbazepina y 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina, caracterizándose los anticuerpos por haberse generado frente a un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Anticuerpos según la reivindicación 4, caracterizados además por tener suficiente sensibilidad como para usarse en aplicaciones de monitorización terapéutica de fármacos (TDM), toxicológicas y ambientales.
6. Anticuerpos según la reivindicación 4, que tienen una CI<sub>50</sub> de aproximadamente 2 ng/ml para carbamazepina, de aproximadamente 3 ng/ml para 10,11-epóxido de carbamazepina, de aproximadamente 3 ng/ml para 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, de aproximadamente 1 ng/ml para oxcarbazepina y

de aproximadamente 15 ng/ml para 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina.

- 5
7. Método de detección o determinación de una o más de carbamazepina, 10,11-epóxido de carbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, oxcarbazepina y 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina en una muestra *in vitro* de un individuo o una muestra ambiental que comprende: poner en contacto la muestra con uno o más anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6; detectar o determinar la cantidad del uno o más agentes de detección que compiten por la unión con uno o más de los anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6; y deducir la presencia de o la cantidad de uno o más de carbamazepina, 10,11-epóxido de carbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, oxcarbazepina, y 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina en la muestra.
- 10
8. Kit para detectar o determinar uno o más de carbamazepina, 10,11-epóxido de carbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, oxcarbazepina y 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina, que comprende uno o más anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 15
9. Anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que son anticuerpos policlonales.

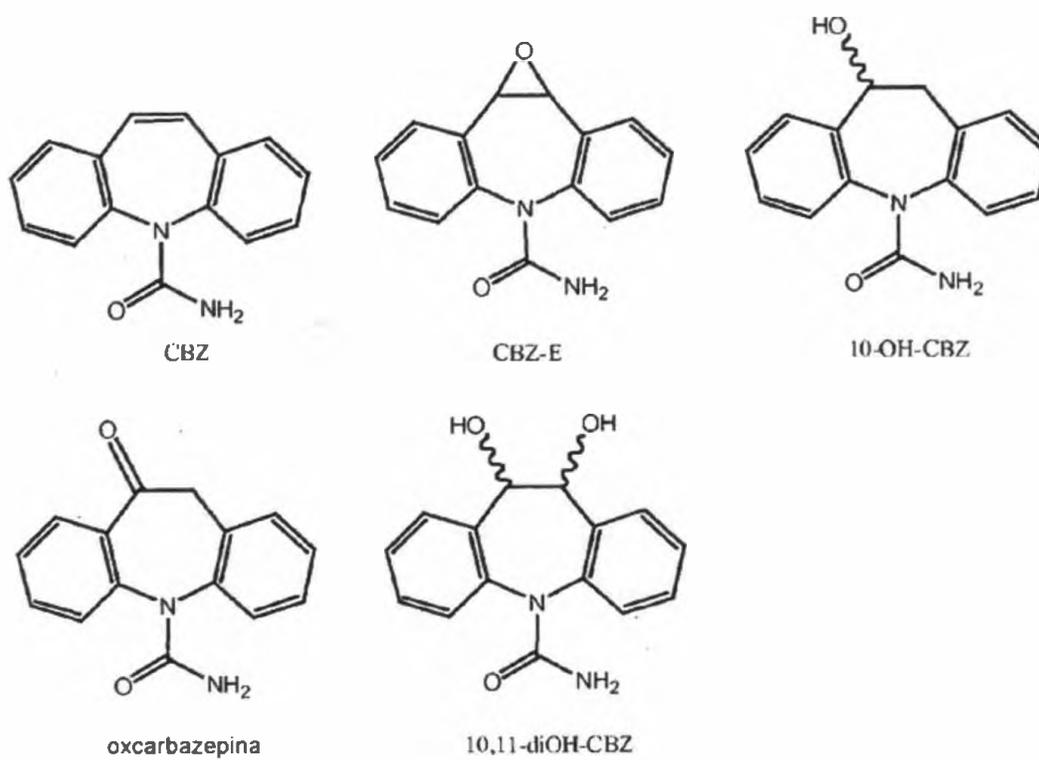


Figura 1

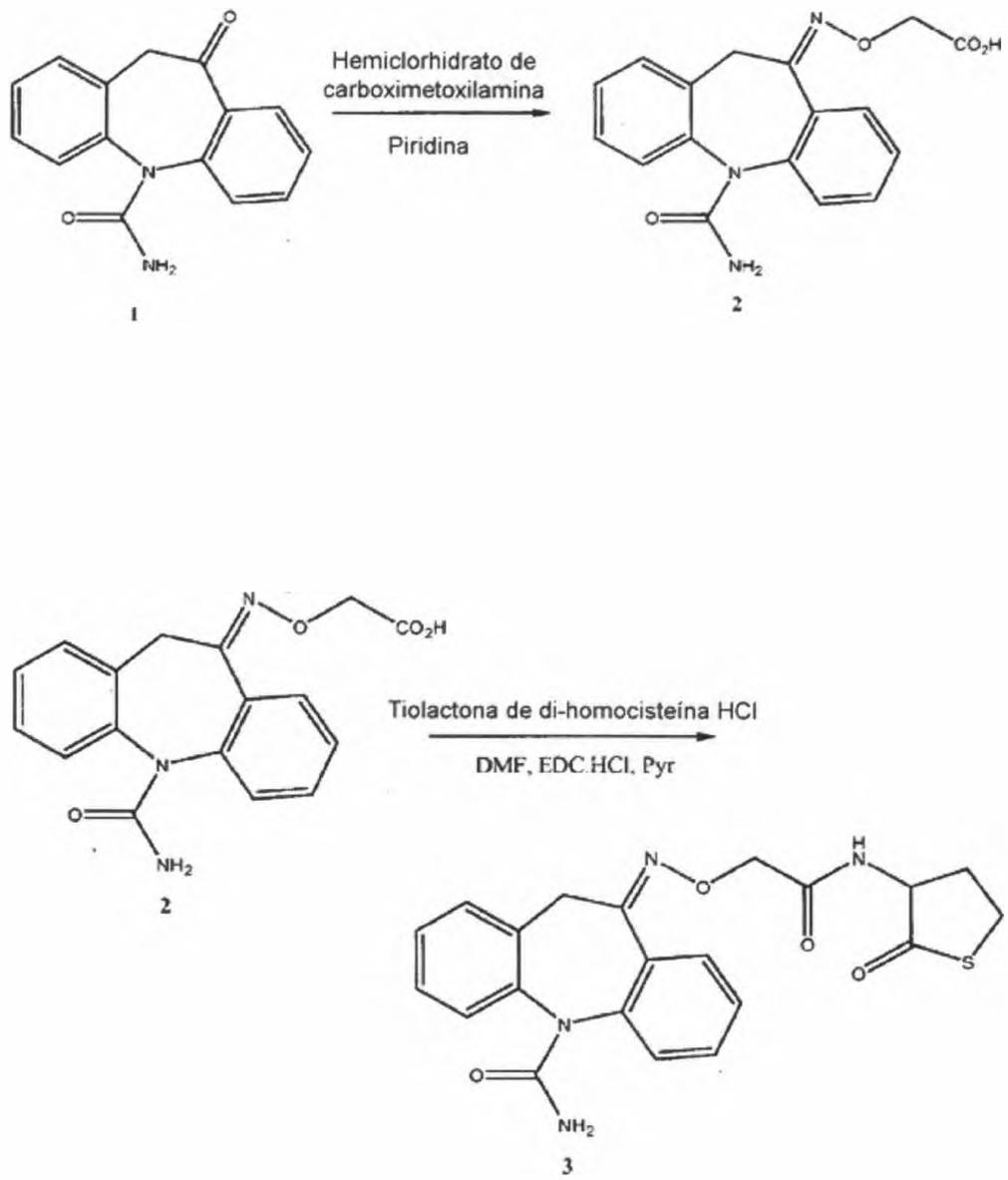


Figura 2