

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 390**

51 Int. Cl.:

A61K 31/497 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2010 PCT/US2010/029566**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11022089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2010 E 10810301 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2467139**

54 Título: **Inmunoensayo de imatinib**

30 Prioridad:

19.08.2009 US 543699

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

05.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SALAMONE, SALVATORE, J.;
COURTNEY, JODI, BLAKE y
VOLKOV, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 645 390 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

Inmunoensayo de imatinib

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los inmunoensayos para la determinación de la presencia y/o la cuantificación de la cantidad de imatinib o sus sales farmacológicamente aceptables en fluidos corporales humanos con el fin de determinar rápidamente las concentraciones óptimas del fármaco durante la quimioterapia.

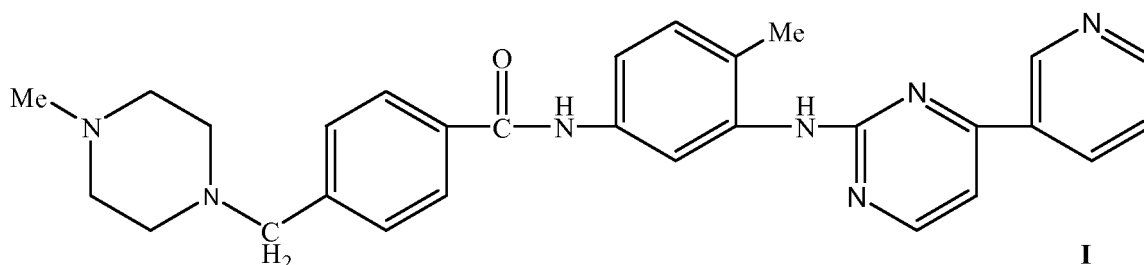
10

Antecedentes de la invención

Cáncer es un término usado para describir un grupo de neoplasias en que todas comparten la característica común de desarrollarse cuando las células comienzan a crecer fuera de control en una parte del cuerpo. La mayoría de los cánceres se forman como tumores, pero también se pueden manifestar en la sangre y circular a través de otros tejidos donde crecen. Las neoplasias malignas son las más comúnmente tratadas con una combinación de cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. El tipo de tratamiento usado para tratar un determinado cáncer depende de varios factores que incluyen el tipo de neoplasia maligna y la etapa durante la cual se ha diagnosticado.

15

20 Imatinib tiene la siguiente fórmula:



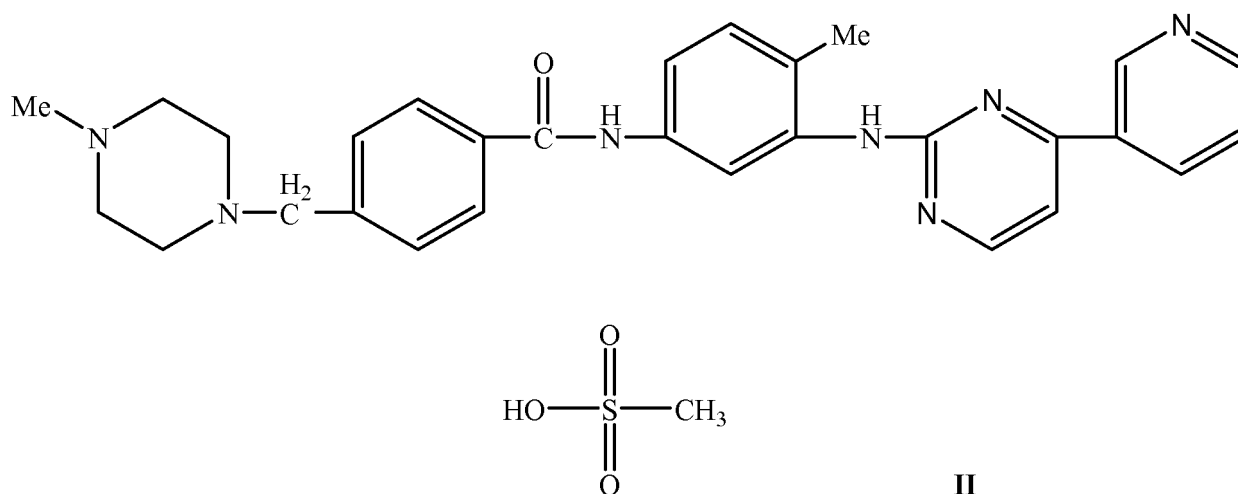
25

y sus sales, particularmente el mesilato de imatinib, son uno de los agentes quimioterapéuticos más comúnmente usados para el tratamiento de leucemia mieloide crónica con cromosoma Filadelfia positivo en fase blástica, en fase acelerada o en fase crónica (inserto del paquete Gleevec, Novartis Pharmaceuticals Corporation, julio de 2004).

30

Se ha demostrado que el imatinib tiene una variabilidad interpaciente de hasta 16 veces en las concentraciones mínimas y que esta variabilidad puede afectar la eficacia. (Picard et.al. Blood 2007: 109; 3496-3499, Larson et al. Blood 2008,111: 4022-4028, Demetri et.al. J Clin Oncol 2009, 27: 3141-3147)

La sal preferida de imatinib es mesilato de imatinib y tiene la fórmula:



35

Dado que la eficacia de imatinib se mejora a niveles mínimos más elevados y dado que el fármaco presenta una amplia variabilidad farmacocinética del fármaco, el control de las concentraciones de este fármaco en sangre y el ajuste a niveles diana sería de valor en el aumento de la eficacia y la minimización de la toxicidad. El grado de variabilidad farmacocinética intraindividual e interindividual de imatinib y sus sales se ha comunicado que es de 16 veces y se ve afectado por muchos factores, que incluyen:

40

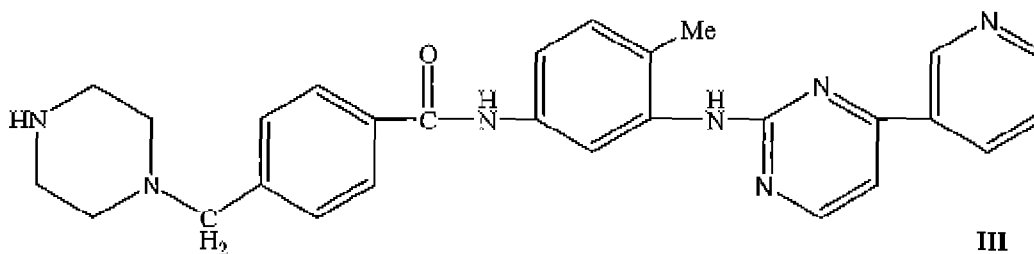
- La función del órgano
- La regulación génica
- El cuadro clínico
- La edad
- 5 ◦ La interacción entre fármacos
- El tiempo de consumo del fármaco
- El cumplimiento

10 Como resultado de esta variabilidad, las mismas dosis del mismo fármaco en diferentes individuos puede dar lugar a resultados clínicos marcadamente diferentes. La eficacia de la misma dosificación de imatinib o sus sales varía de manera significativa basándose en la tasa de excreción del fármaco del individuo y la concentración sérica final del fármaco en el paciente. La gestión del fármaco terapéutico podría proporcionar al médico una visión sobre la variación de la administración del fármaco en el paciente. Con la gestión del fármaco terapéutico, se podrían individualizar las dosificaciones para el paciente, y las posibilidades de tratar el cáncer de manera eficaz sin los efectos secundarios indeseados serían mucho mayores.

15 Además, la gestión del fármaco terapéutico de imatinib o sus sales podría servir como una excelente herramienta para asegurar el cumplimiento (Henk, et al. Proc ASCO 2006, abst. 6083, Feng, et al. Proc ASCO 2006, abst. 6038) de la administración de quimioterapia con la dosificación prescrita real y el alcance de los niveles de concentración sérica eficaces. La gestión habitual del fármaco terapéutico de imatinib o sus sales requeriría la disponibilidad de ensayos automatizados simples adaptables a un equipo general de laboratorio. Se ha descrito el uso de cromatografía de líquidos (LC)/espectrometría de masas en tándem para determinar la concentración de imatinib, las sales de imatinib o sus metabolitos quimioterapéuticos en la sangre y el plasma humanos (Guetens, J Pharm Biomed Anal., 33(5):879-89 2003; Bakhtiar, J Chromatography B, 768(2):325-340, 2002; Titier, Ther. Drug. Monit., 25 (27)5:634-640, 2005). También se ha desarrollado un método de LC para determinar la pureza de imatinib, las sales de imatinib o sus metabolitos terapéuticos (Vivekanand, J Pharm Biomed Anal., 28(6):1183-94, 2002) pero no se usó para determinar los niveles en los fluidos biológicos. Estos métodos son de mano de obra intensiva, usan equipos caros y no son susceptibles de uso habitual en laboratorio clínico. Se ha desarrollado un ensayo enzimático para 30 medir imatinib expuesto en la patente de Estados Unidos N.º 7.300.768. Sin embargo, no existen inmunoensayos simples para determinar la presencia o cuantificar la cantidad de imatinib en fluidos biológicos humanos de pacientes tratados con este agente quimioterapéutico.

35 Como se deduce de lo anterior, no existen inmunoensayos para determinar la presencia y/o cuantificar la cantidad de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en fluidos biológicos humanos. La gestión habitual del fármaco terapéutico de imatinib y sus sales farmacológicamente activas mediante inmunoensayos proporcionaría ensayos automatizados simples adaptados a un equipo convencional de laboratorio. Sin embargo, con el fin de proporcionar tales inmunoensayos, se deben producir anticuerpos específicos para imatinib y sus sales farmacológicamente activas. Los derivados e inmunógenos usados en este ensayo deben impartir mediante estos correspondientes anticuerpos producidos una reactividad específica a imatinib y sus sales farmacológicamente activas sin ninguna reactividad cruzada sustancial con los metabolitos terapéuticamente activos o inactivos o farmacológicamente 40 activos o inactivos de imatinib y sus sales. Con el fin de ser eficaces en el control de los niveles de fármaco, los anticuerpos deberían ser específicos para imatinib y sus sales farmacológicamente activas y no reaccionar de manera cruzada con el N-desmetil imatinib

45 El metabolito activo de imatinib que se da en muestras de pacientes tratados con imatinib y sus sales es N-desmetil imatinib, que tiene la fórmula:



50 Es este metabolito farmacológicamente activo el que impide la determinación precisa de imatinib y sus sales mediante inmunoensayos de muestras de pacientes tratados con imatinib y sus sales. Por lo tanto, desde hace mucho tiempo se desea proporcionar anticuerpos específicos para imatinib y sus sales farmacológicamente activas y que no reaccionen de manera cruzada con el N-desmetil imatinib

55 Sumario de la invención

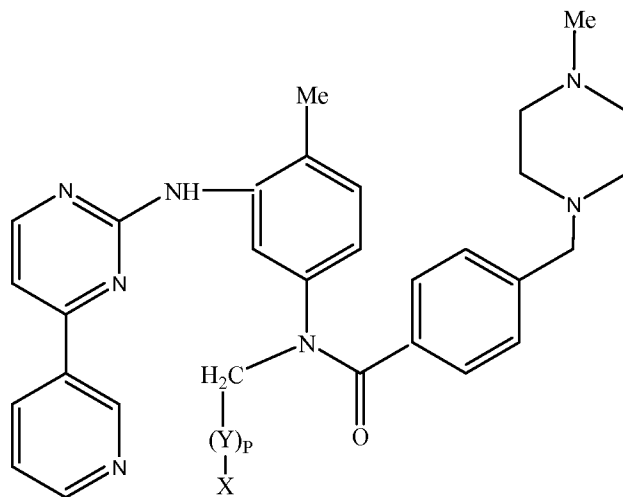
De acuerdo con la presente invención, se ha producido una nueva clase de anticuerpos que son sustancial y selectivamente reactivos con imatinib y sus sales farmacológicamente activas de manera que se unan

selectivamente a imatinib y sus sales farmacológicamente activas sin ninguna reacción cruzada sustancial con su metabolito de imatinib farmacológicamente activo, N-desmetil imatinib. Por selectivamente reactivos, se entiende que este anticuerpo solamente reacciona con el imatinib y sus sales farmacológicamente activas y tiene una reactividad cruzada con el metabolito farmacológicamente activo de imatinib, N-desmetil imatinib, de menos del 15 %. El

5 metabolito N-desmetil imatinib impide la determinación precisa mediante un inmunoensayo de la presencia y las cantidades de imatinib y sus sales farmacológicamente activas en fluidos biológicos humanos.

Se ha descubierto que mediante el uso de inmunógenos que son conjugados de un vehículo que contienen un polímero inmunogénico que tiene un grupo funcional tiol o un grupo funcional amino reactivos con un compuesto de

10 la fórmula:



IV

o sus sales farmacológicamente activas.

15

en donde Y es un grupo espaciador orgánico;

X es un grupo funcional terminal capaz de unirse a dicho vehículo mediante dicho grupo amino o tiol y;

p es un número entero de 0 a 1;

20 se producen anticuerpos que son específicos para imatinib o sus sales farmacológicamente activas y no reaccionan de manera sustancial con o se unen a N-desmetil imatinib. Además, estos anticuerpos no presentan reactividad cruzada de manera sustancial con ninguno de sus metabolitos de imatinib terapéuticamente activos o inactivos

25 La provisión de estos anticuerpos que reaccionan sustancial y selectivamente con imatinib y sus sales farmacológicamente activas y no reaccionan de manera cruzada con N-desmetil imatinib permite producir un inmunoensayo que puede detectar de manera específica y cuantificar de manera que controle el imatinib y sus sales farmacológicamente activas en las muestras de fluido de pacientes que se están tratando con imatinib o sus sales farmacológicamente activas. También incluidos en la presente invención hay reactivos y kits para dicho inmunoensayo. La presencia del metabolito activo de imatinib, N-desmetil imatinib, es la causa principal de lecturas

30 imprecisas en inmunoensayos para imatinib o sus sales farmacológicamente activas.

Descripción detallada

35 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una nueva clase de anticuerpos que sustancial y selectivamente reacciona con imatinib o sus sales farmacológicamente activas y no reacciona de manera sustancial o de manera cruzada con sus metabolitos tal como se menciona anteriormente en el presente documento. Se ha descubierto que mediante el uso de estos derivados de imatinib de fórmula IV como inmunógenos, se proporciona esta nueva clase de anticuerpos de la presente invención. Mediante el uso de estos anticuerpos se ha desarrollado un inmunoensayo que incluye reactivos y kits para tal inmunoensayo para detectar y/o cuantificar imatinib y sus

40 sales farmacológicamente activas en sangre, plasma u otras muestras de fluidos corporales. Mediante el uso del presente inmunoensayo, se puede detectar y/o cuantificar la presencia y cantidad de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en muestras de fluido corporal de pacientes que se están tratando con este agente quimioterapéutico. De esta manera, se puede controlar durante la terapia a un paciente que se está tratando con imatinib o sus sales farmacológicamente activas y ajustar su tratamiento de acuerdo con dicho control. Mediante la

45 presente invención se logra la gestión de fármaco terapéutico de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en pacientes de cáncer que se están tratando con imatinib o sus sales farmacológicamente activas como un agente quimioterapéutico.

El agente quimioterapéutico a detectar es imatinib de fórmula I o sus sales farmacológicamente activas. Estas sales incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, sales con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o con ácidos orgánicos carboxílico o sulfónico adecuados, por ejemplo, ácidos alifáticos mono o dicarboxílico, tales como ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico o ácido oxálico, o aminoácidos tales como arginina o lisina, ácidos carboxílicos aromáticos, tales como ácido benzoico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácidos carboxílicos aromáticos-alifáticos, tales como ácido mandélico o ácido cinámico, ácidos carboxílicos heteroaromáticos, tales como ácido nicotínico o ácido isonicotínico, ácidos sulfónicos alifáticos, tales como ácido metanosulfónico, etanosulfónico o 2-hidroxietanosulfónico, o ácidos sulfónicos aromáticos, por ejemplo, ácido benceno-2 sulfónico, p-tolueno-2 sulfónico o naftaleno-2 sulfónico. El ácido preferido es ácido metanosulfónico.

Los reactivos utilizados en el ensayo para la presente invención son conjugados de un vehículo que tienen un grupo funcional tiol o un grupo funcional amino reactivos con los compuestos de fórmula IV. Estos conjugados son compañeros de unión competitiva con el imatinib y sus sales farmacológicamente activas presentes en la muestra para la unión con los anticuerpos de la presente invención. Por lo tanto, la cantidad de reactivo conjugado que se une al anticuerpo será inversamente proporcional a la cantidad de imatinib y sus sales farmacológicamente activas en la muestra. De acuerdo con la presente invención, el ensayo utiliza cualquier medio de medición convencional para la detección y la medición de la cantidad de dicho conjugado que se une o desune del anticuerpo. Mediante el uso de dichos medios, se puede determinar la cantidad de conjugado unido o desunido. En general, la cantidad de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en una muestra se determina mediante la correlación de la cantidad medida del conjugado unido o desunido producido por el imatinib o sus sales farmacológicamente activas en la muestra con valores del conjugado unido o desunido determinado a partir del patrón o curva de calibración obtenida con muestras que contienen cantidades conocidas de imatinib o sus sales farmacológicamente activas, cuyas cantidades conocidas están en el intervalo esperado para la muestra a ensayar. Estos estudios para generar curvas de calibración se determinan usando el mismo procedimiento de inmunoensayo que el usado para la muestra.

Definiciones

A lo largo de la presente descripción, deben entenderse las siguientes definiciones:

El término "Ph" tal como se usa a lo largo de la presente solicitud designa un radical fenilo. El término "alquileo" designa un sustituyente hidrocarbonado divalente saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a diez átomos de carbono

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

El término "conjugado" se refiere a cualquier sustancia formada a partir de la unión conjunta de partes separadas. Los conjugados representativos de acuerdo con la presente invención incluyen aquellos formados por la unión conjunta de una pequeña molécula, tal como el compuesto de fórmula IV, y una molécula grande, tal como un vehículo que tiene uno o más grupos tiol funcionales o grupos amino funcionales reactivos, cuyo vehículo puede ser un polímero de poliamina, particularmente proteína. En el conjugado, la molécula pequeña podría unirse a uno o más sitios activos en la molécula grande. El término conjugado incluye el término inmunógeno.

"Haptenos" son antígenos parciales o incompletos. Son sustancias sin proteína, principalmente sustancias de bajo peso molecular, que no son capaces de estimular la formación de anticuerpos, pero que reaccionan con anticuerpos. Los últimos están formados acoplado un hapteno con un vehículo inmunogénico de alto peso molecular y después inyectando este producto acoplado, es decir, inmunógeno, en un sujeto humano o animal. EL hapteno de la presente invención es imatinib o sus sales farmacológicamente activas.

Tal como se usa en el presente documento, un "grupo espaciador" o un "espaciador" se refiere a una porción de una estructura química que conecta dos o más subestructuras tales como haptenos, vehículos, inmunógenos, etiquetas o marcadores mediante un grupo de unión funcional. Estos grupos espaciadores se enumerarán en lo sucesivo en el presente documento, en la presente solicitud. Los átomos de un grupo espaciador y los átomos de una cadena en el grupo espaciador están conectados mediante enlaces químicos. Entre los espaciadores preferidos están las cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas. Estas cadenas de carbono también pueden incluir uno o más heteroátomos en la cadena o en los extremos de las cadenas. Con "heteroátomos" se refiere a átomos que no sean de carbono que se eligen del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. Los grupos espaciadores también pueden incluir grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos en la cadena.

El número de átomos en el grupo espaciador se determina mediante recuento de los átomos que no sean de hidrógeno. El número de átomos en una cadena en un grupo espaciador se determina mediante el recuento del número de átomos que no sean de hidrógeno a lo largo de la ruta más corta entre las subestructuras que se están conectando. Se puede usar un grupo de unión funcional para activar, por ejemplo, proporcionar un sitio funcional

disponible en, un hapteno o grupo espaciador para sintetizar un conjugado de un hapteno con una etiqueta o vehículo o polímero de poliamina.

5 Un "vehículo inmunogénico", tal como se usa la expresión en el presente documento, es una sustancia inmunogénica, comúnmente una proteína o proteína modificada para contener un grupo tiol o un grupo amino reactivos, que se puede unir a una o más posiciones con un hapteno, en el presente caso imatinib, permitiendo de este modo a los derivados de hapteno inducir una respuesta inmunitaria y provocar la producción de anticuerpos que se pueden unir de manera específica con estos haptenos. Los vehículos inmunogénicos y los grupos de unión se enumerarán en lo sucesivo en el presente documento, en la presente solicitud. Entre las sustancias de vehículo
10 inmunogénico se incluyen proteínas, glucoproteínas, complejos poliaminopolisacáridos, partículas y ácidos nucleicos que se reconocen como extrañas y por lo tanto provocan una respuesta inmunológica del hospedador. Los poliaminopolisacáridos se pueden preparar a partir de polisacáridos usando cualquiera de los medios convencionales conocidos para esta preparación.

15 También se pueden emplear diversos tipos de proteínas como un vehículo inmunogénico de poli(aminoácidos). Estos tipos incluyen albúminas, proteínas séricas, lipoproteínas, etc. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*), hemocianina de lapa californiana (KLH, del inglés *keyhole limpet hemocyanin*), ovoalbúmina de huevo, tiroglobulina bovina (BTG, del inglés *bovine thyroglobulin*). Como alternativa, se pueden utilizar poli(aminoácidos) sintéticos.

20 Los vehículos inmunogénicos también pueden incluir poliaminopolisacáridos, que son un polímero de alto peso molecular construido por condensaciones repetidas de monosacáridos. Los ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa, gomas de carbohidratos tales como goma arábiga, agar, etc. El polisacárido también contiene restos de poliaminoácidos y/o restos de lípido.

25 El vehículo inmunogénico también puede ser poli(ácido nucleicos) bien solos o conjugados con uno de los poli(aminoácidos) o polisacáridos mencionados anteriormente.

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

40 "Poli(aminoácido)" o "polipéptido" es una poliamida formada a partir de poliaminoácidos. Los poli(aminoácidos) generalmente oscilarán desde aproximadamente un peso molecular de 2.000, sin tener un límite superior de peso molecular, siendo normalmente menor de 10.000.000 y normalmente de no más de aproximadamente 600.000 daltons. Normalmente serán intervalos diferentes, dependiendo de si está implicado un vehículo inmunogénico o una enzima,

45 un "péptido" es cualquier compuesto formado por la unión de dos o más aminoácidos mediante uniones amida (peptídicas), normalmente un polímero de α -aminoácidos en el que el grupo α -amino de cada resto de aminoácido (excepto el término NH_2) se une al grupo α -carboxilo del siguiente resto en una cadena lineal. Los términos péptido, polipéptido y poli(aminoácido) se usan como sinónimos en el presente documento para referirse a esta clase de compuestos sin restricción en cuanto al tamaño. Los miembros más grandes de esta clase se citan como proteínas.

50 Una "etiqueta", "molécula detectora", o "marcador" es cualquier molécula que produce o que se puede inducir para producir, una señal detectable. la etiqueta se puede conjugar con un analito, inmunógeno, anticuerpo o con otra molécula tal como un receptor o una molécula que se puede unir a un receptor tal como un ligando, particularmente un hapteno. Los ejemplos de etiquetas incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fragmentos de enzimas, sustratos
55 enzimáticos, inhibidores enzimáticos, coenzimas, catalizadores, fluoróforos, colorantes, quimioluminiscentes, luminiscentes o sensibilizadores; una partícula magnética o no magnética, un soporte sólido, un liposoma, un ligando o un receptor.

60 El término "anticuerpo" se refiere a un compañero de unión específica de proteína para un antígeno y es cualquier sustancia o grupo de sustancias, que tiene una afinidad de unión específica por un antígeno para la exclusión de otras sustancias. El término genérico anticuerpo abarca anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo.

65 El término "derivado" se refiere a un compuesto o molécula química preparada a partir de un compuesto parental mediante una o más reacciones químicas.

El término "vehículo" se refiere a partículas sólidas y/o polímeros poliméricos que tienen un grupo funcional tiol o un grupo funcional amino reactivos tal como polímeros inmunogénicos tales como aquellos mencionados anteriormente. Cuando el vehículo es una partícula sólida, la partícula sólida se puede unir, recubrir con o enlazar de algún modo con un polímero de poliamina para proporcionar uno o más sitios reactivos para la vinculación con el grupo X funcional terminal en los compuestos de la fórmula IV. Por otro lado, los inmunoensayos de la presente invención se pueden llevar a cabo recubriendo el anticuerpo sobre las partículas sólidas.

El término "kit de reactivo", o "kit de ensayo", se refiere a un ensamblaje de materiales que se usan en la realización de un ensayo. Los reactivos se pueden proporcionar en una combinación empaquetada en el mismo envase o en envases separados, dependiendo de las reactividades cruzadas y estabildades, y en forma líquida o liofilizada. Las cantidades y proporciones de reactivos proporcionados en el kit se pueden seleccionar de manera que proporcionen resultados óptimos para una aplicación particular. Un kit de reactivo que incorpora las características de la presente invención comprende anticuerpos específicos para Imatinib o sus sales farmacológicamente activas, El kit puede comprender adicionalmente ligandos del analito y materiales de calibración y control. Los reactivos pueden permanecer en forma líquida o se pueden liofilizar.

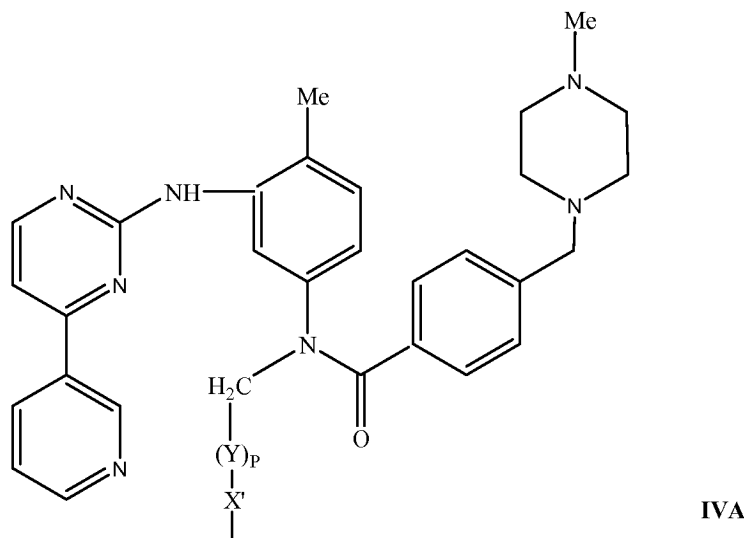
La frase "materiales de calibración y de control" se refiere a cualquier patrón o material de referencia que contiene una cantidad conocida de fármaco a medir. La concentración de fármaco se calcula comparando los resultados obtenidos de la muestra desconocida con los resultados obtenidos para el patrón. Esto se hace frecuentemente construyendo una curva de calibración.

La expresión "muestra biológica" incluye cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o un antiguo ser vivo. Tales seres vivos incluyen seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos, caballos y otros animales. Tales sustancias incluyen sangre, suero, plasma, orina, células, órganos, tejidos, óseo, médula ósea, linfa, los nodos linfáticos, tejido sinovial, condrocitos, macrófagos sinoviales, células endoteliales y piel.

Reactivos e inmunógenos

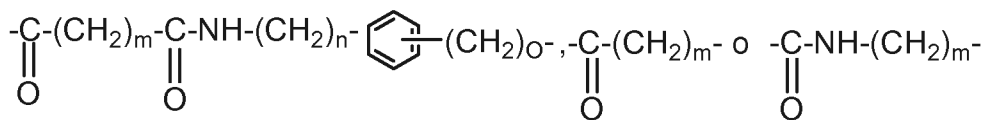
En un inmunoensayo basado en un anticuerpo, se construye un conjugado de imatinib para competir con el imatinib y sus sales farmacológicamente activas en la muestra por los sitios de unión en el anticuerpo. En el inmunoensayo de la presente invención, los reactivos de la fórmula IV son derivados de imatinib sustituidos con nitrógeno formados en el puente amida de imatinib de fórmula I. En los compuestos de fórmula IV, el espaciador del enlazador constituye la porción "Y-X" de esta molécula. Este enlazador X y el espaciador. "Y" son convencionales en la preparación de conjugados para inmunoensayos e inmunógenos para la producción de anticuerpos. Se puede utilizar cualquiera de los grupos convencionales que se unen al espaciador utilizados para preparar conjugados para inmunoensayos e inmunógenos para producir anticuerpos en los compuestos de fórmula IV. Tales enlazadores y espaciadores convencionales se desvelan en la Patente de Estados Unidos 5.501.987 y en la Patente de Estados Unidos 5.101.015.

Los conjugados, así como los inmunógenos, se preparan a partir del compuesto de fórmula I. En los conjugados o inmunógenos del vehículo con el hapteno, los vehículos se enlazan en una o más posiciones a uno o más grupos amino o tiol reactivos contenidos en la porción polimérica del vehículo al hapteno que tiene la fórmula:



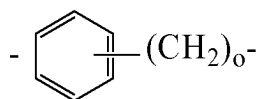
en donde X' es un grupo de unión funcional capaz de unirse a dicho vehículo mediante dicho grupo amino o tiol y p e Y son como anteriormente;

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



5

o



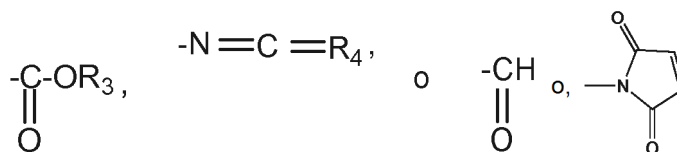
10

en donde n y o son números enteros de 0 a 6, y m es un número entero de 1 a 6 con alquilenos siendo el grupo espaciador especialmente preferido.

En los compuestos de fórmula IV-A, donde X' es un grupo funcional que se une al espaciador, preferentemente mediante un grupo amino o tiol reactivo en el vehículo polimérico. El grupo X' es el resultado del grupo X funcional terminal en los compuestos de fórmula IV que se unen al grupo amino o tiol reactivo en el polímero del vehículo o el inmunógeno. Cualquier grupo funcional terminal capaz de reaccionar con un grupo amino o tiol se puede utilizar como el grupo X funcional en los compuestos de fórmula IV. Estos grupos funcionales terminales preferentemente incluidos en C son:

15

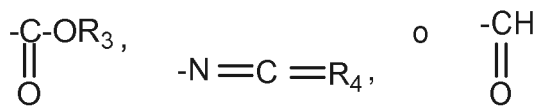
20



en donde R₃ es hidrógeno o tomado junto con su átomo de oxígeno unido forma un éster reactivo y R₄ es oxígeno o azufre. El radical -N=C=R₄, puede ser un isocianato o un isotiocianato. Los ésteres activos formados mediante OR₃ incluyen imidoéster, tales como N-hidroxisuccinamida, 1-hidroxibenzotriazol y p-nitrofenil éster. Sin embargo, se puede usar cualquier éster activo que pueda reaccionar con un grupo amino.

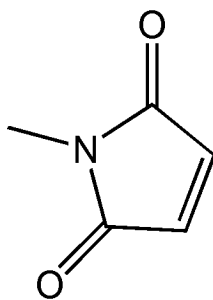
25

Cuando X en el compuesto de fórmula IV es



30

estos compuestos preferentemente reaccionan con los grupos amino libres del vehículo polimérico o inmunogénico. Por otra parte, cuando X en el compuesto de fórmula IV es el radical maleimida de la fórmula

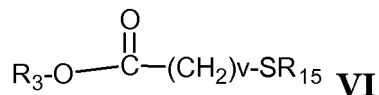


35

este compuesto reacciona preferentemente con grupo tiol (o SH) que puede estar presente en el vehículo polimérico o de proteína, incluyendo los inmunógenos, para producir el grupo funcional de maleimida como X' en los compuestos de la fórmula IV-A.

De acuerdo con una realización, de la presente invención en donde X' es una maleimida en los compuestos de fórmula IV se une a una proteína polimérica que se ha modificado para convertir un grupo amino reactivo a un grupo tiol. Esto se puede hacer haciendo reaccionar un grupo amino libre de un vehículo de proteína polimérica con un compuesto de la fórmula

5



en donde R₁₅ es un grupo protector de tiol;

R₃ es como anteriormente; y

v es un número entero de 1 a 4.

10

De esta manera, el grupo tiol, SH- llega a ser el grupo funcional del vehículo unido al resto del portador. La reacción para convertir el grupo amino reactivo de la proteína se lleva a cabo en un medio acuoso mezclando la proteína que contiene el vehículo con el compuesto de fórmula VI en un medio acuoso. En esta reacción, la temperatura y la presión no son críticas y la reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y a presión atmosférica. Las temperaturas desde 10 °C hasta 25 °C son generalmente preferidas. En la siguiente etapa se hace reaccionar el vehículo con el tiol modificado con el compuesto de fórmula IV, después el grupo protector de tiol del vehículo se retira del producto de reacción resultante del compuesto de fórmula V con el vehículo de proteína.

15

20

Cualquier medio convencional para retirar un grupo protector de tiol se puede utilizar para llevar a cabo esta reacción. Sin embargo, al utilizar un medio para retirar el grupo protector de tiol, se debe tener cuidado de que los reactivos sean solubles en el medio acuoso y de que no destruyan o dañen de ningún modo el polímero de poliamina contenido en el vehículo. Un medio preferido para retirar este grupo protector es mediante el uso de ditioneitol como un agente para reducir el producto de condensación resultante. Esta reducción se puede llevar a cabo añadiendo simplemente el agente reductor al medio de reacción sin utilizar altas presiones o temperaturas. Esta reducción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y a presión atmosférica. Cualquier agente protector de tiol convencional se puede utilizar en el compuesto de fórmula VI. Los grupos protectores de tiol son bien conocidos en la materia, siendo el 2-piridilditio el grupo protector preferido.

25

30

Aunque que el método anterior representa un medio para convertir un grupo amino terminal en el vehículo que contiene la poliamina polimérica a un grupo tiol, se puede utilizar cualquier medio convencional para llevar a cabo esta conversión. Los métodos para convertir grupos amino terminal en vehículos que contienen poliamina polimérica a tioles son bien conocidos en la materia y se pueden emplear de acuerdo con la presente invención.

35

La reacción del vehículo que contiene la poliamina polimérica que tiene un grupo tiol terminal reactivo con el compuesto de fórmula IV donde X es un grupo funcional capaz de unirse al grupo tiol terminal que lleva el vehículo se puede llevar a cabo por medios convencionales. En la realización preferida, la maleimida que lleva el X en el compuesto de fórmula IV se hace reaccionar con el grupo tiol que lleva el vehículo de poliamina polimérica. Cualquier medio bien conocido para la adición de un tiol a través de un enlace doble de maleimida se puede utilizar en la producción de conjugados de fórmula VI A que se conjugan mediante un puente de tiol.

40

El grupo carboxílico y los ésteres activos se acoplan al vehículo o al polímero inmunogénico por medios convencionales. El grupo amino en el polímero de poliamina, tal como una proteína, produce un grupo amida que conecta el espaciador al polímero, inmunógenos o vehículo y/o conjugados de la presente invención.

45

En los inmunógenos conjugados de la presente invención, los enlaces químicos entre el hapteno imatinib que contiene el grupo carboxilo y los grupos amino reactivos en el polímero de poliamina que está contenido en el vehículo o inmunógeno se pueden establecer usando varios métodos conocidos por el experto en la materia. Frecuentemente se prefiere formar enlaces amida. Los enlaces amida se forman en primer lugar activando el resto de ácido carboxílico en los compuestos de fórmula IV-A haciendo reaccionar el grupo carboxilo con un reactivo de grupo de salida (por ejemplo, N-hidroxiuccinimida, 1-hiroxiensotriazol y p-nitrofenol). Se puede usar un agente de activación tal como dicilohexilcarbodiimida y diisopropilcarbodiimida. La forma activada del grupo carboxilo en el hapteno imatinib de fórmula VI-A se hace reaccionar después con una solución tamponada que contiene el vehículo con el grupo amino reactivo.

50

Por otro lado, cuando X es un isocianato terminal o un radical tioisocianato en el compuesto de fórmula IV, cuando estos radicales reaccionan con los aminos libres de un polímero de poliamina producen el conjugado o inmunógeno de fórmula IV-A donde X' es

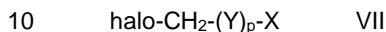
60



con el grupo amino en el vehículo de poliamina o en el polipéptido inmunogénico.

5 Cuando X, en los compuestos de fórmula IV contiene un radical aldehído, estos compuestos se pueden conectar a los grupos amino libres del polipéptido de poliamina en el vehículo mediante un enlace amino mediante aminación reductiva. Se puede usar cualquier método convencional de condensación de un aldehído con una amina tal como la aminación reductiva para formar este enlace. En este caso, X' en las porciones de ligando de fórmula IV es $-CH_2-$.

Los compuestos de fórmula IV se forman haciendo reaccionar el imatinib de fórmula I con un haluro de fórmula:



15 en donde p, Y y X son como anteriormente para formar el compuesto de fórmula IV. Cualquier medio convencional de hacer reaccionar un haluro con el nitrógeno en la amida se puede utilizar en la condensación del compuesto de fórmula VII para esta posición de amida en el imatinib de fórmula I. El uso de un haluro en el compuesto de fórmula VII proporciona un medio eficiente para formar tal amida sustituida mediante condensación con el grupo amida en el compuesto de fórmula I.

20 Cuando el compuesto de fórmula I está en la forma de su sal es necesario convertir esta sal en su base libre antes de hacerla reaccionar con el compuesto de fórmula V para formar el compuesto de fórmula IV. Esto se puede llevar a cabo por medios convencionales tales como la neutralización de la sal. Cuando la sal es una sal básica, la neutralización se puede realizar en un medio acuoso mediante adición de un ácido. Cuando la sal es una sal de adición de ácido, la neutralización se realiza en un medio acuoso mediante la adición de una base.

25 El compuesto de fórmula IV se puede convertir en los inmunógenos y/o los reactivos del conjugado de la presente invención haciendo reaccionar estos compuestos con un vehículo que contiene una poliamina o un polipéptido. Se puede utilizar el mismo polipéptido como el vehículo y como el polímero inmunogénico en el inmunógeno de la presente invención siempre que la poliamina o el polipéptido sean inmunológicamente activos. Sin embargo, para formar los conjugados, estos polímeros no necesitan producir una respuesta inmunitaria tal como necesitan los inmunógenos. De acuerdo con la presente invención, los diversos grupos funcionales representados por X en los compuestos de fórmula IV se pueden conjugar con el vehículo que contiene polímero con un grupo amino reactivo por medios convencionales de unión de un grupo funcional a un grupo amino contenido en el polímero. De acuerdo con una realización preferida, en el compuesto de fórmula IV cuando la unión es mediante un grupo amino reactivo en el vehículo, X es un grupo de ácido carboxílico o un éster activo del mismo.

35 ANTICUERPOS

40 La presente invención también se refiere a nuevos anticuerpos que incluyen anticuerpos monoclonales para imatinib o sus sales farmacológicamente activas producidos mediante la utilización de los inmunógenos mencionados anteriormente. De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que estos anticuerpos producidos de acuerdo con la presente invención son reactivos de manera selectiva con imatinib o sus sales farmacológicamente activas y no reaccionan con N-desmetil imatinib que interfiere con los inmunoensayos para imatinib y sus sales farmacológicamente activas. La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para no reaccionar con N-desmetil imatinib hace que estos anticuerpos proporcionen un inmunoensayo para detectar la presencia y/o cuantificar la cantidad de imatinib y sus sales farmacológicamente activas en muestras de fluido de pacientes

45 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos y a anticuerpos monoclonales para imatinib o sus sales farmacológicamente activas. El antisuero de la invención se puede producir de manera conveniente mediante la inmunización de animales hospedadores con los inmunógenos de la presente invención. Los animales hospedadores adecuados incluyen roedores, tal como, por ejemplo, ratones, ratas, conejos y cobayas o mamíferos superiores tales como cabras, ovejas y caballos. Las dosis iniciales, los sangrados y las dosis de refuerzo se pueden dar de acuerdo con los protocolos aceptados para provocar respuestas inmunitarias en animales, por ejemplo, en una realización preferida, los ratones recibieron una dosis inicial de 100 ug de inmunógeno/ratón, i.p. y dos o más dosis de refuerzo posteriores de entre 50 y 100 ug de inmunógeno /ratón durante un período de seis meses. Mediante el sangrado período de sangrado, se observó que las muestras de sangre de los ratones inmunizados desarrollaban una respuesta inmunitaria frente a la unión a imatinib o sus sales farmacológicamente activas utilizando inmunoensayos convencionales. Estos métodos proporcionan una manera conveniente de reconocer hospedadores que están produciendo antisuero que tiene la actividad deseada. También se reconocieron anticuerpos frente a los metabolitos principales de imatinib o sus sales farmacológicamente activas y no presentaron unión sustancial a estos compuestos.

50 Los anticuerpos monoclonales se producen de manera conveniente mediante la inmunización de ratones Balb/c de acuerdo con la pauta anterior seguida por la inyección de los ratones con 100 ug de inmunógeno i.p. o i.v. en tres días sucesivos comenzando cuatro días antes de la fusión celular. También se pueden utilizar otros protocolos en la materia de los anticuerpos. El protocolo de inmunización completa detallado en el presente documento proporcionó un protocolo óptimo para la respuesta de anticuerpos séricos para el anticuerpo contra imatinib o sus sales farmacológicamente activas.

Los linfocitos B obtenidos del bazo, de la sangre periférica, de los ganglios linfáticos u otro tejido del hospedador se puede usar como la célula productora de anticuerpos monoclonales. Lo más preferido son linfocitos B obtenidos del bazo. Los hibridomas capaces de generar los anticuerpos monoclonales deseados de la invención se obtienen fusionando tales linfocitos B con una línea celular inmortal, que es una línea celular que proporciona estabilidad a largo plazo del cultivo tisular en la célula híbrida. En la realización preferida de la invención, la célula inmortal puede ser una célula linfoblastoide o una célula de plasmocitoma tal como una célula de mieloma, en sí misma una célula productora de anticuerpos pero también maligna. Los hibridomas murinos que producen anticuerpos monoclonales para imatinib o sus sales farmacológicamente activas se forman mediante la fusión de células de mieloma de ratón y células de bazo de ratones inmunizados frente a conjugados de proteína con imatinib o sus sales farmacológicamente activas. Los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante la clonación de los genes que expresan anticuerpos a partir de las células de hibridoma y empleando métodos de ADN recombinante bien conocidos en la actualidad en la técnica para unir la subsecuencia de la región variable de ratón a las regiones constantes humanas o para combinar regiones marco humanas con regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina de rata o de ratón donador. Un método mejorado para llevar a cabo la humanización de anticuerpos monoclonales murinos que proporciona anticuerpos de afinidades mejoradas se expone en la Solicitud de Patente Internacional WO 92/11018.

Se pueden producir fragmentos de polipéptido que comprenden solo una parte de la estructura primaria de los anticuerpos, cuyos fragmentos poseen una o más actividades de inmunoglobulina. Estos fragmentos de polipéptido se pueden producir mediante escisión proteolítica de anticuerpos intactos mediante métodos bien conocidos en la materia o mediante la inserción de codones de parada en los lugares deseados en vectores de expresión que contienen los genes de anticuerpo usando mutagénesis de sitio dirigido para producir fragmentos Fab o fragmentos (Fab')₂. Los anticuerpos de cadena simple se pueden producir uniendo las regiones CL y VH con un enlazador de ADN (véase Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85:5879-5883 (1988) y Bird et al., Science, 242:423-426 (1988)).

Los anticuerpos de la presente invención son selectivos para imatinib y sus sales farmacológicamente activas sin tener ninguna reactividad cruzada con N-desmetil imatinib. Además, estos anticuerpos no presentan reactividad cruzada de manera sustancial con ninguno de sus metabolitos de imatinib terapéuticamente activos o inactivos. Sin tener reactividad cruzada significa que los anticuerpos de la presente invención tienen una reactividad cruzada en relación con imatinib y sus sales farmacológicamente activas con estos metabolitos, particularmente N-desmetil imatinib, de menos del 15 %, preferentemente de menos del 10 %.

INMUNOENSAYOS

De acuerdo con la presente invención, los conjugados y los anticuerpos generados a partir de los inmunógenos de estos compuestos de fórmula IV se pueden utilizar como reactivos para la determinación de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en muestras de pacientes. Esta determinación se realiza por medio de un inmunoensayo. Cualquier inmunoensayo en el que los conjugados de reactivo formados a partir de los compuestos de fórmula IV compiten con el imatinib o sus sales farmacológicamente activas en la muestra por los sitios de unión en los anticuerpos generados de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para determinar la presencia de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en una muestra de pacientes. El modo de llevar a cabo tal ensayo para imatinib o sus sales farmacológicamente activas en una muestra de la que se sospecha que contiene imatinib o sus sales farmacológicamente activas, comprende combinar (a) una muestra de medio acuoso, (b) un anticuerpo para imatinib o sus sales farmacológicamente activas generado de acuerdo con la presente invención y (c) los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmula IV o las mezclas de los mismos. La cantidad de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en la muestra se puede determinar midiendo la inhibición de la unión al anticuerpo específico de una cantidad conocida del conjugado añadido a la mezcla de la muestra y anticuerpos. El resultado de la inhibición de tal unión de la cantidad conocida de conjugados mediante la muestra desconocida se compara con los resultados obtenidos en el mismo ensayo utilizando soluciones patrón conocidas de imatinib o sus sales farmacológicamente activas. En la determinación de la cantidad de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en una muestra desconocida, la muestra, los conjugados formados a partir de los compuestos de la fórmula IV y el anticuerpo se pueden añadir en cualquier orden.

Se pueden utilizar diversos medios para medir la cantidad de conjugado formado a partir de los compuestos de fórmula IV unido al anticuerpo. Un método es cuando la unión de los conjugados al anticuerpo provoca una disminución en la tasa de rotación de un conjugado de fluoróforo. La cantidad de descenso en la tasa de rotación de un conjugado de fluoróforo en la mezcla líquida se puede detectar mediante la técnica de polarización fluorescente tal como la desvelada en la Patente de Estados Unidos 4.269.511 y la Patente de Estados Unidos 4.420.568.

Por otra parte, el anticuerpo se puede recubrir o adsorber sobre nanopartículas de manera que cuando estas partículas reaccionen con los conjugados de imatinib o sus sales farmacológicamente activas formados a partir de los compuestos de fórmula IV, estas nanopartículas formen un agregado. Sin embargo, cuando las nanopartículas recubiertas de o con anticuerpo adsorbido reaccionen con el imatinib o sus sales farmacológicamente activas en la muestra, el imatinib o sus sales farmacológicamente activas de la muestra unidas a estas nanopartículas no genera la agregación de las nanopartículas de anticuerpo. La cantidad de agregación o aglutinación se puede medir en la

mezcla de ensayo mediante absorbancia.

Por otra parte, estos ensayos se pueden llevar a cabo teniendo bien el anticuerpo o bien los conjugados de imatinib o sus sales farmacológicamente activas unidas a un soporte sólido tal como una placa de microtitulación o cualquier otro soporte sólido convencional, incluyendo partículas sólidas. La unión de anticuerpos y proteínas a tales partículas sólidas es bien conocida en la materia. Cualquier método convencional se puede utilizar para llevar a cabo tales uniones. En muchos casos, con el fin de ayudar a la medición, se pueden colocar etiquetas sobre los anticuerpos, los conjugados o las partículas sólidas, tales como etiquetas radiactivas o etiquetas de enzima, como ayuda en la detección de la cantidad de los conjugados formados a partir de los compuestos de fórmula IV que se unen o desunen del anticuerpo, Otras etiquetas adecuadas incluyen cromóforos, fluoróforos, etc.

Por cuestiones de conveniencia, los componentes del ensayo de la presente invención se pueden proporcionar en un kit, una combinación empaquetada con cantidades predeterminadas de nuevos reactivos empleados en el ensayo para imatinib o sus sales farmacológicamente activas. Estos reactivos incluyen el anticuerpo de la presente invención, así como, los conjugados formados a partir de los compuestos de la fórmula IV.

Además de estos reactivos necesarios, se pueden incluir aditivos tales como reactivos auxiliares, por ejemplo, estabilizantes y tampones. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo, Los reactivos se pueden proporcionar en solución o como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones adecuadas para realizar el ensayo.

Ejemplos

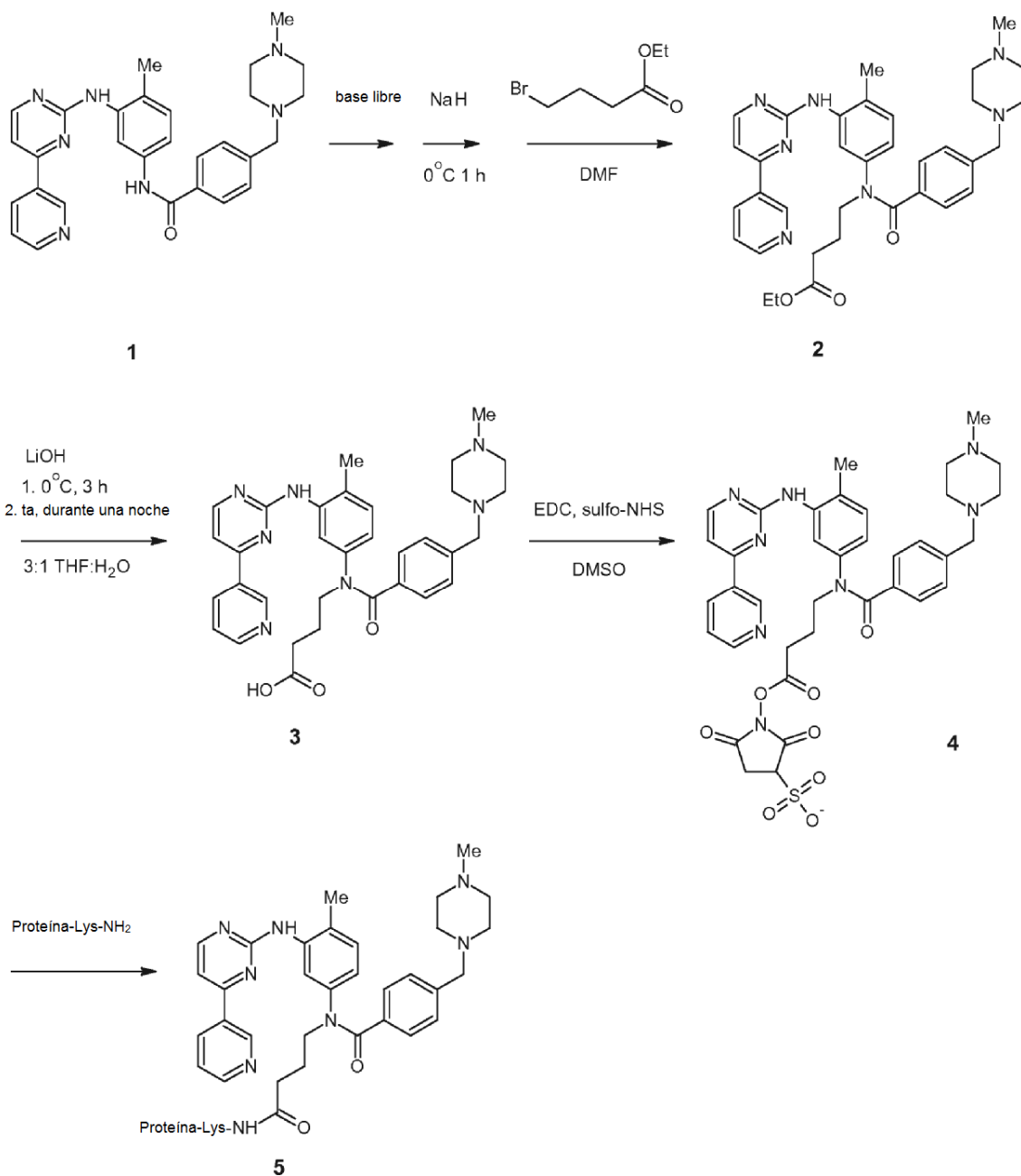
En los ejemplos, las siguientes abreviaturas se usan para designar lo siguiente:

NaH	hidruro sódico
THF	tetrahidrofurano
DMF	dimetilformamida
LiOH	Hidróxido de litio
EDC	clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
DMSO	dimetilsulfóxido
MeOH	metanol
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
APCI	espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica
TLC	Cromatografía en capa fina
HOAc	ácido acético
CHCl ₃	cloroformo
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
ANS	ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico
HRP	peroxidasa de rábano picante
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TRIS	clorhidrato de Tris(hidroximetil)aminometano
BSA	albúmina de suero bovino
KLH	hemocianina de lapa californiana
PBS	solución salina tamponada con fosfato
diH ₂ O	agua desionizada

En los ejemplos, el Esquema 1 a continuación expone los compuestos específicos preparados y citados mediante números en los Ejemplos. La composición de tampón de fosfato tiene una solución acuosa que contiene fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) 15,4 mM, fosfato de sodio monobásico (NaH₂HPO₄) 4,6 mM, pH = 7,2±0,10

El éter usado en los Ejemplos fue dietiléter. Las partes o porcentajes dados en estos ejemplos son partes por volumen.

Esquema 1

**Ejemplos**

5

Ejemplo 1

Extracción de mesilato de imatinib

- 10 Se trituraron con un mortero y una maja hasta hacer polvo fino catorce comprimidos, conteniendo cada uno 400 mg del imatinib como la sal de mesilato; el recubrimiento del comprimido no se eliminó primero. El polvo de los comprimidos triturados se agitó en 1500 ml de MeOH al 10 % (por volumen)/ CH_2Cl_2 durante cuatro horas. La mezcla de los comprimidos triturados que contiene mesilato de imatinib se filtró a través de Celite y se eliminó el disolvente para proporcionar 7,14 gramos de un sólido amarillo que contiene mesilato de imatinib. El sólido amarillo
- 15 que contiene mesilato de imatinib se disolvió en 75 ml de cloroformo caliente al 20 % (por volumen) en etanol para producir una solución de mesilato de imatinib, después se añadieron 50 ml de éter:etanol a 1:1 (volumen:volumen), provocando que la solución de mesilato de imatinib se volviese turbia. El enfriamiento en hielo indujo la precipitación de mesilato de imatinib, que continuó progresando con la adición lenta de éter. El mesilato de imatinib precipitado se depositó en capas con éter, se cubrió y se permitió que se estabilizase toda la noche.

El mesilato de imatinib precipitado se recogió mediante filtración y se lavó con 50 ml de etanol frío al 10 % (por volumen) en éter, después se secó al vacío para obtener 6,42 g (el 115 %) de mesilato de imatinib como un sólido amarillo claro. La recrystalización de mesilato de imatinib a partir de cloroformo/etanol con la ayuda de éter se llevó a cabo una segunda vez para proporcionar 4,45 g (el 79 %) de mesilato de imatinib como un sólido amarillo claro. Este sólido amarillo claro de mesilato de imatinib aislado a partir de los comprimidos se usó en el Ejemplo 2. La estructura se confirmó mediante RMN y análisis elemental. La pureza se confirmó mediante HPLC.

Ejemplo 2

10 Preparación de la base libre de imatinib

La sal de mesilato de imatinib (1) (1,01 g, 1,71 mmol) preparada en el Ejemplo 1 se añadió a 250 ml de diclorometano para formar una suspensión de mesilato de imatinib. Se añadieron 50 ml de NaHCO₃ acuoso saturado al 10 % y se mezcló bien con la suspensión de mesilato de imatinib en diclorometano para producir la base libre de imatinib en la capa orgánica (diclorometano). La emulsión formada a partir del NaHCO₃ acuoso y el diclorometano se retiró mediante filtración, produciendo una capa orgánica de diclorometano que contiene el imatinib como la base libre y una capa acuosa. La capa orgánica de diclorometano que contiene imatinib como la base libre se separó de la capa acuosa. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄/MgSO₄. Para aislar la base libre de imatinib, la capa orgánica (diclorometano) se filtró para eliminar el Na₂SO₄/MgSO₄ y después se separó, produciendo un sólido que contiene la base libre de imatinib. Se añadió tolueno al sólido que contiene la base libre de imatinib y se evaporó rápidamente tres veces y después se secó al vacío para eliminar cualquier resto de agua. La base libre de imatinib se obtuvo como un sólido blanco y se usó en el ejemplo 3. La base libre de imatinib presentó datos de RMN de ¹H, ¹³C y de APCI consistentes con la estructura. Las asignaciones de RMN se basaron en un experimento DQF-COSY.

25 Ejemplo 3

Preparación de etiléster de ácido butírico de Imatinib

La base libre de imatinib seca preparada en el ejemplo 2 se disolvió en 35 ml de DMF seco en nitrógeno y se enfrió en hielo. La mezcla que contiene imatinib se agitó de manera eficaz y el hidruro de sodio sólido (dispersión del 60 % en aceite mineral, 0,111 g, 2,78 mmol, 1,6 equiv.) se añadieron a la vez. Una solución de 4-bromobutirato de etilo (0,59 g, 3,0 mmol, 1,8 equiv.) en 3,5 ml de DMF se añadió lentamente mediante una jeringa a la mezcla que contiene imatinib, y se dejó que la reacción para producir el etiléster de ácido butírico de imatinib (2) tuviera lugar durante la noche, calentándose a temperatura ambiente con el baño. El análisis *in situ* de la mezcla de la reacción mediante APCI(+) mostró un m/z = 608,3 (100 %), 494,2 (30 %), y 722,4 (5 %) uma, correspondiente con el etiléster de ácido butírico de imatinib (2), material de partida de imatinib, y un etiléster de ácido dibutírico de imatinib, respectivamente.

La mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de diclorometano, se enfrió en hielo y se desactivó con 10 ml de agua. Se separaron el diclorometano que contiene los etilésteres de ácido butírico de imatinib y las capas acuosas. Para aumentar el rendimiento, se extrajo la capa acuosa con 3 x 50 ml de diclorometano y 2 x 25 ml de acetato de etilo. Las fracciones orgánicas combinadas que contienen los derivados de etiléster de ácido butírico de imatinib se separaron, dejando una mezcla de derivados de imatinib. Para aislar el etiléster de ácido butírico de imatinib, se sometió a la mezcla a cromatografía en 100 g de gel de sílice usando un gradiente de metanol/diclorometano del 5-50 %. El etiléster de ácido butírico de imatinib resultante (2) tenía una masa de 0,61 g (el 59 %) de TLC R_f = 0,36 (MeOH: CHCl₃: HOAc a 1:4:0,05). APCI (+) m/z = 608,3 uma.

Ejemplo 4

50 Hidrólisis de etiléster de ácido butírico de imatinib

Se disolvió etiléster de ácido 4-[[4-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-benzoil]-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-amino]-butírico (2) (1,21 g, 2,0 mmol, 1 equiv.) en 60 ml de THF y se enfrió en hielo. Se añadió una solución de LiOH·H₂O (0,28 g, 6,7 mmol, 3,4 equiv.) en 20 ml de agua por goteo mientras se agitaba. La reacción de hidrólisis se incubó durante 3 h a 0 °C y después se dejó que procediese durante la noche, mientras se calentaba a temperatura ambiente para producir el ácido libre, ácido butírico de imatinib.

Tras el enfriamiento, a la mezcla de reacción que contiene el ácido butírico de imatinib en hielo, se le añadió HCl 0,5 M (aq) por goteo para obtener un pH de 5-6. Se separaron los disolventes volátiles para proporcionar un producto de reacción en bruto que contiene el ácido butírico de imatinib como un sólido blanco. Para eliminar impurezas, el producto de la reacción en bruto se trituró en agua, se recogió por filtración y se secó al vacío y después se trituró en éter para proporcionar el derivado de ácido butírico de imatinib, compuesto 3, como un sólido amarillo, de masa 0,99 g (el 86 %) como la sal parcial de HCl. Punto de fusión: 203-207 °C (dec). TLC R_f = 0,26 (7:1:0,1) CH₂Cl₂: MeOH:NH₄OH APCI (+) m/z = 580,2 uma. La RMN de ¹H (dmso-d₆, 80 °C) es consistente con la estructura. El análisis para C₃₃H₃₇N₇O₃·1,65H₂O·1HCl requiere C: 64,48; H: 6,25; N: 15,83; Cl: 0,63. C encontrado: 64,65; H: 6,64; N: 15,99; Cl: 0,58. la pureza de la HPLC fue del 100 %.

Ejemplo 5

Preparación de éster de imatinib activado por Sulfo-NHS

- 5 El ácido butírico de imatinib se derivatizó (3) mediante la reacción con EDC y sulfo-NHS para producir el éster de imatinib activado por sulfo-NHS para la conjugación eventual con las proteínas (ejemplos 6a, b, 7). A los 5 ml de DMSO anhidro agitado se le añadió compuesto 3 (94 mg, 0,16 mmol), seguido de EDC (94 mg, 0,49 mmol) y sulfo-NHS (107 mg, 0,49 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas en nitrógeno para producir el éster de imatinib activado por sulfo-NHS. La mezcla de reacción se usó de manera directa en los Ejemplos 6a y 6b.

Ejemplo 6a

Preparación de inmunógeno de Imatinib

- 15 Se preparó una solución de proteína de KLH disolviendo 300 mg de KLH en 19,6 ml de tampón fosfato (50 mM, pH 7,5) y después se añadieron lentamente 39,2 ml de DMSO mientras se agitaba la solución de proteína de KLH en hielo. La agitación continuó durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente, seguido de la adición del derivado de imatinib activado por sulfo-NHS (4) preparado en el Ejemplo 5 (2,532 ml, 0,08 mmol). La mezcla de reacción de KLH y el derivado de imatinib activado (4) se dejaron en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente en una botella de cristal ámbar, produciendo un conjugado de imatinib-KLH (5). El conjugado de imatinib-KLH se purificó después mediante diálisis frente a DMSO al 66 % en tampón fosfato (50 mM, pH 7,5) a temperatura ambiente. A continuación, la proporción de DMSO se redujo de manera gradual: al 60 %, al 50 %, al 40 %, al 20 %, al 10 % y al 0 %. La última diálisis se realizó frente a tampón fosfato a 4 °C. El conjugado de imatinib-KLH (5) se caracterizó mediante espectroscopía de ultravioleta-visible. El conjugado se diluyó a una concentración final de 2 mg/ml en tampón fosfato (50 mM, pH 7,5).

Ejemplo 6b

- 30 Preparación de inmunógeno de Imatinib

Se preparó un inmunógeno de Imatinib como en el Ejemplo 6a excepto en que el conjugado de imatinib-KLH (5) se diluyó a una concentración final de 2 mg/ml en tampón fosfato y DMSO (50 % en volumen).

Ejemplo 7

Preparación de conjugado de Imatinib-BSA con derivado 4

- 40 Se preparó una solución de proteína de BSA disolviendo 1.000 mg de BSA en tampón fosfato (50 mM, pH 7,5) a una concentración final de 50 mg/ml. Se añadieron lentamente 40 ml de DMSO a la solución de proteína de BSA mientras se agitaba en hielo. La agitación continuó durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente, seguido de la adición del derivado de imatinib activado por sulfo-NHS (4) preparado en el Ejemplo 5 (0,437 ml, 0,014 mmol). La cantidad de derivado de imatinib activado por sulfo-NHS (4) añadida a la solución de proteína de BSA se calculó para una proporción molar de 1:1 entre el derivado de imatinib (4) y BSA. La mezcla de BSA y derivado de imatinib activado (4) se dejó en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente en una botella de cristal ámbar para producir el conjugado del éster de imatinib activado (4) y BSA. Este conjugado se purificó después mediante diálisis frente a DMSO al 66 % en tampón fosfato (50 mM, pH 7,5) a temperatura ambiente. A continuación, la proporción de DMSO se redujo de manera gradual: al 60 %, al 50 %, al 40 %, al 20 %, al 10 % y al 0 %. La última diálisis se realizó frente a tampón fosfato a 4 °C. El conjugado de imatinib-BSA se caracterizó mediante espectroscopía UV/VIS.

Ejemplo 8a

Preparación de anticuerpos policlonales para Imatinib

- 55 Se inmunizaron de manera i.p. dos grupos de diez ratones BALB/c hembras, un grupo con 100 µg/ratón de inmunógeno de imatinib-KLH tal como se prepara en el Ejemplo 6a (10 ratones) y el otro grupo con 100 µg/ratón de inmunógeno de imatinib-KLH (10 ratones) emulsionado en adyuvante completo de Freund tal como se prepara en el Ejemplo 6b. A los ratones se les reforzó una vez cuatro semanas después de la inyección inicial con 100 µg /ratón de los mismos inmunógenos emulsionados en adyuvante incompleto de Freund. Veinte días después, se obtuvieron de cada ratón sangrados del ensayo de refuerzo que contienen anticuerpos policlonales mediante sangrado orbital. El antisuero de estos sangrados de ensayo contenía anticuerpos de imatinib se evaluaron en los Ejemplos 9, 10a y 11.

Ejemplo 8b

Preparación de anticuerpos monoclonales para Imatinib

5 Los ratones del ejemplo 8a que se inmunizaron con imatinib-KLH preparado en 6b se usaron para producir anticuerpos monoclonales. Para los anticuerpos monoclonales, comenzando tres días antes de la fusión, se inyectó i.p. a los ratones con 400 µg (3 días antes de la fusión), 200 µg (2 días antes de la fusión) y 200 µg (1 día antes de la fusión) de imatinib-KLH en PBS/DMSO preparado en el ejemplo 6b. Las células del bazo se aislaron a partir de los ratones seleccionados y se fusionaron con 2×10^7 células SP2/0 con polietilenglicol 1500 al 50 %, de acuerdo con el método de Coligan, J.E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.1 - 2.5.8, (1992), Wiley & Sons, NY. Las células fusionadas se colocaron en diez placas de 96 pocillos en DMEM/F12 suplementado con FetalClone I al 20 %, L-glutamina al 2 % (100 mM) y 50X HAT al 2 %. Dos o tres semanas después, el sobrenadante de hibridoma se ensayó para la presencia de anticuerpos anti-imatinib mediante ELISA (como en el ejemplo 10b). Las células de los pocillos que dieron resultados positivos en el ELISA (ejemplo 10b) se expandieron a placas de 24 pocillo. Los clones positivos mediante ELISA se subclonaron dos veces mediante dilución limitante de acuerdo con el método desvelado en Coligan, J.E. et al., eds., Current Protocols in Immunology, 2.5.8 - 2.5.17, (1992), Wiley & Sons, NY. Los sobrenadantes de cultivo de hibridoma que contienen anticuerpos monoclonales de subclones seleccionados se confirmaron para la unión a imatinib mediante un ELISA competitivo (ejemplo 11). Estos anticuerpos monoclonales se ensayaron para la unión de imatinib y la reactividad cruzada a un metabolito principal de imatinib, N-desmetil imatinib, mediante ensayo de placa de microtitulación competitivo indirecto tal como se describe en el ejemplo 11.

Ejemplo 9

Procedimiento de sensibilización de placas de microtitulación con conjugado de imatinib-BSA

25 El método ELISA para medir concentraciones de imatinib se realizó en placas de microtitulación (Nunc MaxiSorp F8 Immunomodules) optimizadas para la unión a proteína y que contienen 96 pocillos por placa. Cada pocillo se recubrió con el conjugado de imatinib-BSA (preparado como en el Ejemplo 7) añadiendo 300 µl de conjugado de imatinib-BSA a 10 µg/ml en carbonato de sodio 0,05 M, a pH 9,6, e incubando durante tres horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con carbonato de sodio 0,05 M, a pH 9,6 y después de bloquearon con 375 µl de sacarosa al 5 %, solución de caseinato de sodio al 0,2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la retirada de la solución post-recubrimiento, las placas se secaron a 37 °C durante toda la noche.

Ejemplo 10a

35 Procedimiento de selección de anticuerpos - Título

Este procedimiento es para descubrir la dilución de anticuerpos a usar para el desplazamiento tal como en el Ejemplo 11. El método de ELISA para seleccionar anticuerpos de imatinib (producidos en el Ejemplo 8a y 8b) se realizó con las placas de microtitulación que se sensibilizaron con el conjugado de imatinib-BSA preparado en el Ejemplo 9. El ensayo de selección de anticuerpos se realizó diluyendo el suero murino de los sangrados de ensayo (como en el Ejemplo 8a) que contiene anticuerpos policlonales de imatinib a 1:2.000, 1:6.000, 1:20.000 y 1:50.000 (volumen/volumen) en solución salina tamponada con fosfato que contiene BSA al 0,1 % y timerosal al 0,01 %. Para la evaluación de anticuerpos monoclonales, los sobrenadantes de hibridoma del Ejemplo 8b, que se descubrieron que eran positivos para la presencia de anticuerpo mediante el procedimiento del Ejemplo 10b se diluyeron a 1:2, 1:4, 1:16, etc. (volumen/volumen) en solución salina tamponada con fosfato que contiene BSA al 0,1 % y timerosal al 0,01 %. A cada pocillo de los pocillos sensibilizados con imatinib-BSA (preparados en el ejemplo 9) se le añadieron 50 µl de solución salina tamponada con fosfato que contiene BSA al 0,1 % y timerosal al 0,01 % y 50 µl de anticuerpo diluido y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Durante esta incubación, el anticuerpo se une al conjugado de imatinib absorbido de manera pasiva en los pocillos (Ejemplo 9). Los pocillos de las placas se lavaron tres veces con TRIS 0,02 M, NaCl al 0,9 %, Tween-80 al 0,5 % y timerosal al 0,001 %, a pH 7,8 para eliminar cualquier anticuerpo desunido. Para detectar la cantidad de anticuerpo de imatinib unido al conjugado de imatinib-BSA en los pocillos, se añadieron a cada pocillo 100 µl de un conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón con enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido a una actividad específica (aproximadamente 1/3000) en PBS con BSA al 0,1 %, ANS al 0,05 %, timerosal al 0,01 % capaz de unirse de manera específica con inmunoglobulinas de murino y producir un producto de color cuando se incubaba con un sustrato, en este ejemplo, TMB. Después de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la que el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón con enzima HRP se une a los anticuerpos de imatinib en los pocillos, las placas se lavaron de nuevo tres veces para eliminar el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón con enzima HRP no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado fue seguido por la adición de 100 µl de TMB (sustrato TMB, BioFfx), el sustrato para HRP, para desarrollar color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación para el desarrollo del color, se añadieron 50 µl de solución de parada (fluoruro sódico al 1,5 % en di H₂O) a cada pocillo para detener el desarrollo del color y tras 20 segundos de agitación se determinó la absorbancia a 650 nm (lector de placa de Molecular Devices). La cantidad de anticuerpo en un pocillo fue proporcional a la absorbancia medida y se expresó como la dilución (título) que da como resultado una absorbancia de 1,5. Los títulos se determinaron representando gráficamente la dilución de

anticuerpo del anticuerpo medido (eje x) frente a la absorbancia a 650 nm (eje y) e interpolando el título a una absorbancia de 1,5. El título que produjo la absorbancia de 1,5 determinó la concentración (dilución) de anticuerpo usado en el ensayo de placa de microtitulación competitivo indirecto descrito en el Ejemplo 11.

5 Ejemplo 10b

Procedimiento de selección de anticuerpos - Selección monoclonal

El método de ELISA para seleccionar anticuerpos monoclonales de imatinib (producidos en el Ejemplo 8b) se realizó con las placas de microtitulación que se sensibilizaron con imatinib-BSA tal como se describe en el ejemplo 9. A cada pocillo de los pocillos sensibilizados con imatinib-BSA (preparados en el ejemplo 9) se le añadieron 50 µl de solución salina tamponada con fosfato que contiene BSA al 0,1 % y timerosal al 0,01 % y después 50 µl de sobrenadante de cultivo monoclonal y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Durante esta incubación, el anticuerpo se une al conjugado de imatinib en el pocillo. Los pocillos de las placas se lavaron tres veces con TRIS 0,02 M, 0,9 % de NaCl, Tween-80 al 0,5 % y timerosal al 0,001 %, a pH 7,8 para eliminar cualquier anticuerpo desunido. Para detectar la cantidad de anticuerpo de imatinib unido al conjugado de imatinib-BSA en los pocillos, se añadieron a cada pocillo 100 µl de un conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón con enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido a 1/3000 en PBS con BSA al 0,1 %, ANS al 0,05 %, timerosal al 0,01 % capaz de unirse de manera específica con inmunoglobulinas de murino y producir un producto de color cuando se incubaba con un sustrato, en este ejemplo, TMB. Después de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la que el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón con enzima HRP se une a los anticuerpos de imatinib en los pocillos, las placas se lavaron de nuevo tres veces para eliminar el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón con enzima HRP no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado fue seguido por la adición de 100 µl de TMB (sustrato TMB, BioFfx), el sustrato para HRP, para desarrollar color durante una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación para el desarrollo del color, se añadieron 50 µl de solución de parada (fluoruro sódico al 1,5 % en di H₂O) a cada pocillo para detener el desarrollo del color y tras 10 segundos de agitación se determinó la absorbancia a 650 nm (lector de placa de Molecular Devices). La cantidad de anticuerpo en un pocillo fue proporcional a la absorbancia medida. Las muestras con una absorbancia de más de tres o más veces de fondo se designaron como positivas. Cincuenta muestras con la absorbancia más alta se expandieron a placas de 24 pocillos, tal como se describe en el Ejemplo 8b.

Ejemplo 11

Procedimiento de inmunoensayo competitivo indirecto en placa de microtitulación que determina la CI_{50} y la reactividad cruzada para anticuerpos de Imatinib

El método de ELISA para determinar los valores de la CI_{50} y la reactividad cruzada se realizó con las placas de microtitulación que se sensibilizaron con imatinib-BSA descritas en los Ejemplos 9. Analitos - imatinib y N-desmetil imatinib se diluyeron en diH₂O sobre un intervalo de concentración de 10 a 1.000.000 ng/ml. Cada uno de los ensayos se realizó incubando 50 µl de la solución de imatinib con 50 µl de uno de los anticuerpos seleccionados a partir de los anticuerpos policlonales producidos en el Ejemplo 8a con el inmunógeno del Ejemplo 6a y los producidos en el Ejemplo 8a con el inmunógeno del ejemplo 6b y el anticuerpo monoclonal producido en el Ejemplo 8b. Todos estos ensayos se realizaron diluyendo la concentración de anticuerpos en cada uno de los pocillos al título determinado en el Ejemplo 10a. Durante la incubación de 10 minutos (T.A., con agitación) se da una competición de la unión de anticuerpos para el conjugado de imatinib-BSA en el pocillo (producida en el ejemplo 9) y el analito en solución. Tras esta incubación, los pocillos de la placa se lavaron tres veces con TRIS 0,02 M, 0,9 % de NaCl, Tween-80 al 0,5 % y timerosal al 0,001 %, a pH 7,8 para retirar cualquier material que no estaba unido. Para detectar la cantidad de anticuerpo de imatinib unido al conjugado de imatinib-BSA en los pocillos (producida en el ejemplo 9), se añadieron a cada pocillo 100 µl de un conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón con enzima HRP (Jackson Immunoresearch) diluido a una actividad específica predeterminada (aproximadamente 1/3000) en PBS con BSA al 0,1 %, ANS al 0,05 %, timerosal al 0,01 % capaz de unirse de manera específica con inmunoglobulinas de murino y producir un producto de color cuando se incubaba con un sustrato, en este ejemplo, TMB. Después de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, durante la que el conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón con enzima HRP se une a los anticuerpos de imatinib en los pocillos, las placas se lavaron de nuevo tres veces para retirar el conjugado secundario no unido. Para desarrollar un color medible en los pocillos, el lavado fue seguido por la adición de 100 µl de TMB (sustrato TMB, BioFfx), el sustrato para HRP, para desarrollar color en una incubación de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación para el desarrollo del color, se añadieron 50 µl de solución de parada (fluoruro sódico al 1,5 % en di H₂O) a cada pocillo para detener el desarrollo del color y tras 20 segundos de agitación se determinó la absorbancia a 650 nm (lector de placa de Molecular Devices). La cantidad de anticuerpo en un pocillo fue proporcional a la absorbancia medida e inversamente proporcional a la cantidad de imatinib en la muestra. Las CI_{50} de imatinib y N-desmetil imatinib se determinaron construyendo curvas de respuesta a la dosis con la absorbancia en los pocillos representada frente a la concentración de analito en los pocillos. La absorbancia del color en los pocillos que contienen el analito se comparó con la de sin analito y se generó una curva patrón. El valor de CI_{50} se definió como la concentración de analito que se requiere para tener el 50 % de la absorbancia de los pocillos que no contienen analito. La reactividad cruzada se calculó como la proporción de la CI_{50} de mesilato de imatinib frente a la CI_{50} de N-desmetil imatinib y se expresó

como un porcentaje. Cuando se midió con este grupo de anticuerpos, el porcentaje de reactividades cruzadas referido al imatinib para N-desmetil imatinib fue menor o igual al 7 %. Los resultados para los anticuerpos policlonales para imatinib están en la tabla I a continuación. Cuando se midió con los anticuerpos monoclonales seleccionados, el porcentaje de reactividades cruzadas referido a imatinib para N-desmetil imatinib fue menor del 4 %.

5

TABLA I

Reactividad cruzada de inmunoensayo competitivo que usa anticuerpos policlonales para imatinib (Ejemplo 8a).						
	N.º de sangrado	1	2	3	4	5
	Producido a partir de uno o dos grupos de diez ratones con inmunógeno preparado en el ejemplo:	6b	6b	6b	6a	6a
Analito	Imatinib	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	N-desmetil imatinib	1 %	5 %	2 %	7 %	1 %

TABLA II

Reactividad cruzada de inmunoensayo competitivo que usa anticuerpos monoclonales para imatinib (Ejemplo 8b).		
Analito	Número de anticuerpo monoclonal	
	9F2-4-29	9F2-4-31
Imatinib	100 %	100 %
N-desmetil imatinib	2,7 %	3,2 %

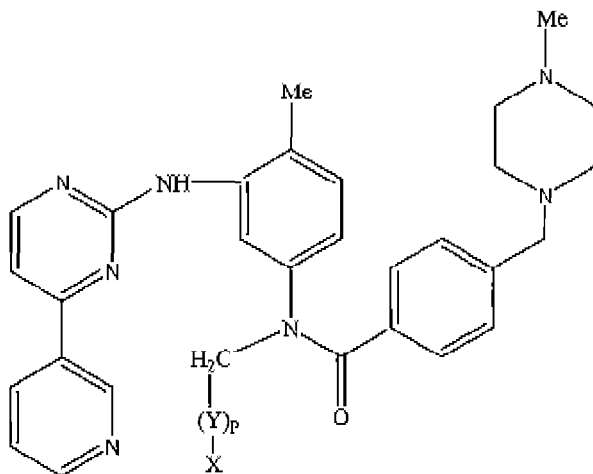
10

Tal como se ve a partir de las Tablas I y II, los anticuerpos producidos de acuerdo con la presente invención que fueron sustancialmente reactivos con el mesilato de imatinib y sustancialmente no reactivos con el metabolito, N-desmetil imatinib.

15

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo para detectar imatinib y sus sales farmacológicamente activas en una muestra que comprende proporcionar una mezcla de una muestra, un anticuerpo reactivo de manera selectiva con imatinib y sus sales farmacológicamente activas que tiene una reactividad cruzada con N-desmetil imatinib de menos del 15 % y un conjugado de un vehículo que contiene un polímero que tiene bien un grupo tiol o un grupo amino reactivos con un compuesto de la fórmula:



IV

10 o sus sales farmacológicamente activas,

en donde Y es un grupo espaciador orgánico;

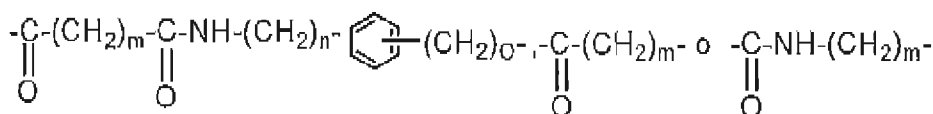
X es un grupo funcional terminal capaz de unirse a dicho vehículo mediante dichos grupos amino o tiol y;

15 p es un número entero de 0 a 1;

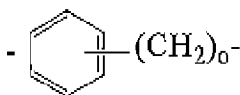
provocando que el imatinib y sus sales farmacológicamente activas en la muestra y dicho conjugado se unan con dicho anticuerpo y posteriormente medir la cantidad de dicho conjugado en dicha mezcla que está unido o desunido a dicho anticuerpo, por lo que se puede determinar la presencia de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en la muestra.

2. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde p es 1.

3. Un inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Y es alquileno que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

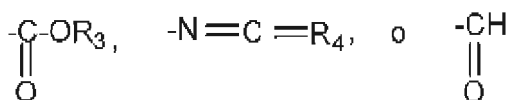


o



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

4. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde X es

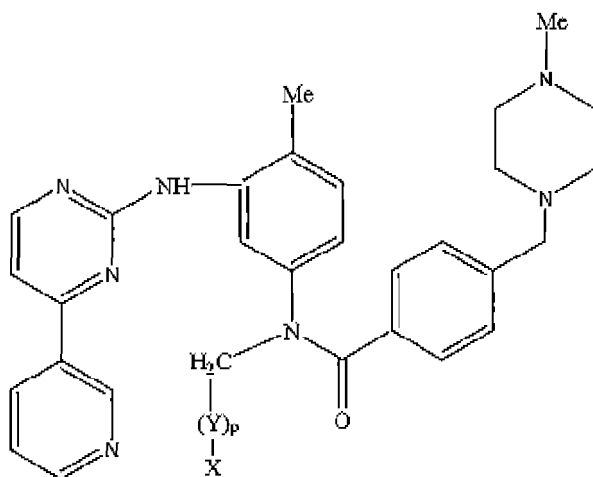


en donde R₃ es hidrógeno o tomado junto con su átomo de oxígeno unido forma un éster reactivo y R₄ es oxígeno o azufre.

5. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra es una muestra humana.

6. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo se genera a partir de un inmunógeno que comprende un vehículo inmunogénico que contiene un polímero que tiene bien un grupo tiol o un grupo amino reactivos unidos a un compuesto de la fórmula:

10



IV

o sus sales farmacológicamente activas, en donde Y, X y p son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

15

7. Un inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo o el conjugado se unen a un soporte sólido, preferentemente placas de microtitulación o nanopartículas.

8. Un anticuerpo que se une de manera selectiva a imatinib y sus sales farmacológicamente activas y tiene una reactividad cruzada con N-desmetil imatinib de menos del 15 %.

20

9. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho anticuerpo proviene de ratones, conejos o ratas.

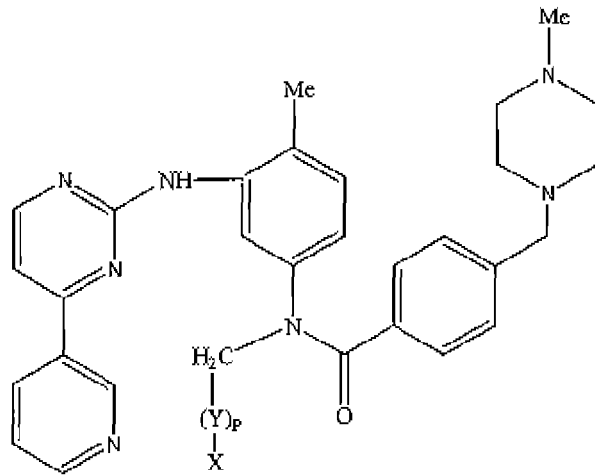
10. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

25

11. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

12. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde dicho anticuerpo proviene de un inmunógeno de un vehículo inmunogénico que contiene un polímero que tiene bien un grupo tiol o un grupo amino reactivo conjugados con un compuesto de la fórmula:

30

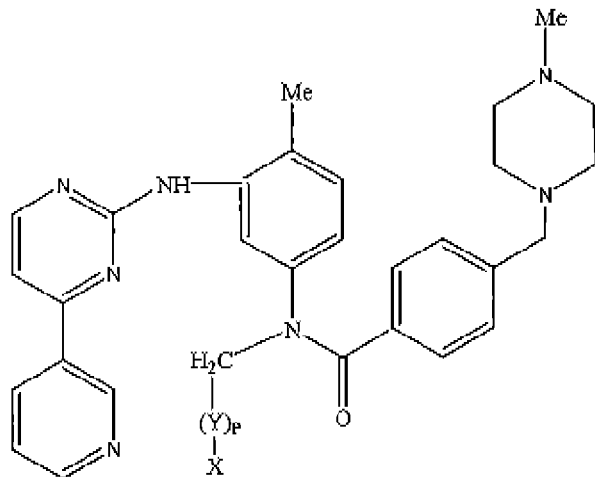


IV

o sus sales farmacológicamente activas,
 en donde Y, X y p son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

5

13. Un compuesto de la fórmula:



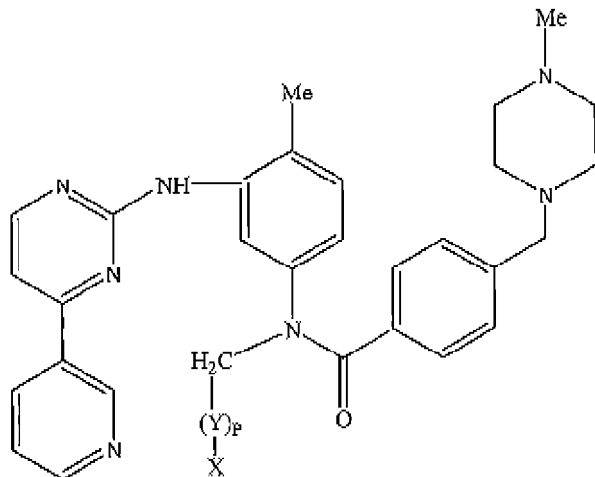
IV

10

o sus sales farmacológicamente activas,
 en donde Y, X y p son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

14. Un conjugado que comprende un vehículo que contiene un polímero que tiene bien un grupo tiol o un grupo amino reactivos conjugados con un compuesto de la fórmula:

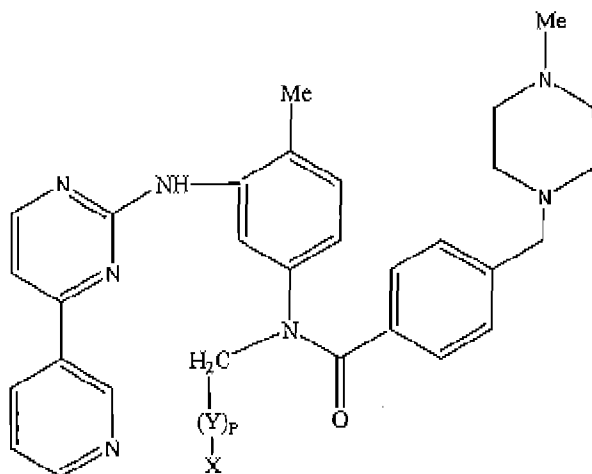
15



IV

o sus sales farmacológicamente activas,
 en donde Y, X y p son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

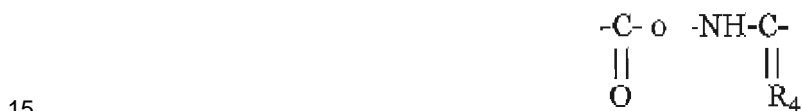
15. Un inmunógeno que comprende un vehículo inmunogénico que contiene un polímero que tiene bien un grupo tiol o un grupo amino reactivos conjugados con un compuesto de la fórmula:



IV

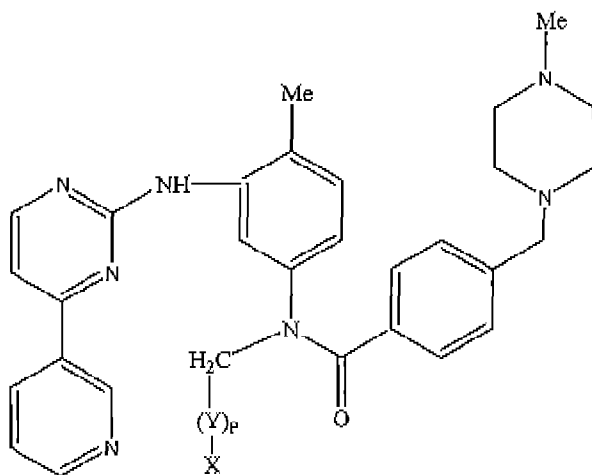
- 10 o sus sales farmacológicamente activas,
 en donde Y, X y p son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

16. Un inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el polímero inmunogénico contiene uno o más grupos amino unidos mediante



en donde P₄ es oxígeno o azufre.

- 20 17. Un kit para determinar la presencia de imatinib o sus sales farmacológicamente activas en una muestra de paciente que comprende reactivos en envases separados, siendo uno de los reactivos un conjugado de un vehículo que contiene un polímero que tiene bien un grupo tiol o un grupo amino reactivos con un compuesto de la fórmula:



IV

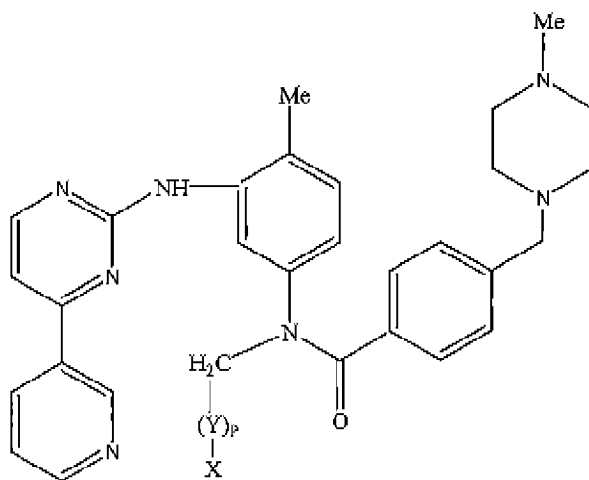
- 25 o sus sales farmacológicamente activas,
 en donde Y, X y p son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
 y un segundo reactivo en un recipiente separado que es un anticuerpo que se une de manera selectiva a imatinib y sus sales farmacológicamente activas y que tiene una reactividad cruzada con N-desmetil imatinib de menos del 15 %.

18. Un kit según la reivindicación 17, en donde dicho conjugado está presente en una cantidad predeterminada en dicho primer envase.

5 19. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en donde dicho kit se usa para determinar la cantidad de imatinib y sus sales farmacológicamente activas en dicha muestra,

20. Un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en donde dicho anticuerpo se genera a partir de un vehículo inmunogénico que contiene un polímero que tiene bien un grupo tiol o un grupo amino reactivos unido a un compuesto de la fórmula:

10



IV

o sus sales farmacológicamente activas,
en donde Y, X y p son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.