(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 652 641**

(51) Int. Cl.:

C07D 215/22 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
C07D 215/227 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013 PCT/US2013/055694**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031584**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 13753773 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2888234**

(54) Título: **Haptenos de aripiprazol y su uso en inmunoensayos**

(30) Prioridad:

21.08.2012 US 201261691450 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2018

(73) Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

(72) Inventor/es:

LIN, RONGHUI;
SALTER, RHYS;
DECORY, THOMAS R.;
HRYHORENKO, ERIC;
REMMERIE, BART M. y
SANKARAN, BANUMATHI

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 652 641 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).

Haptenos de aripiprazol y su uso en inmunoensayos

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de inmunoensayos para determinar la presencia de aripiprazol en fluidos bilógicos humanos.

Antecedentes de la invención

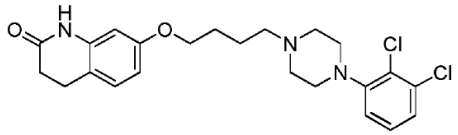
Kubo, M., et al., Revista de Cromatografía B: Ciencias Biomédicas y Aplicaciones 2005, vol. 922, nº 1-2, páginas 294-299 se refiere al desarrollo y validación de un método LC-MS/MS para la determinación cuantitativos de aripiprazol y su metabolito, OPC-14857, en plasma humano.

La esquizofrenia es un trastornos psiquiátrico crónico y debilitante que afecta aproximadamente al 0,45-1% de la población mundial (van Os, J; Kapur, S. "Esquizofrenia" Lancet 2009, 374, 635-645). Los principales objetivos del tratamiento son conseguir una remisión prolongada de síntomas psicóticos, reducir el riesgo y consecuencias de recaída, y mejorar el funcionamiento del paciente y la calidad general de vida. Mientras muchos pacientes con esquizofrenia son capaces de conseguir estabilidad en los síntomas con la medicación anti-psicótica disponible, la poca adherencia a la medicación es una razón común para recaída con medicación oral administrada diariamente. Varios estudios (Abdel-Baki, A.; Ouellet-Plamondon, C.; Malla, A. "Retos en farmacoterapia en paciente con primer episodio de psicosis" Revista de Trastornos Afectivos 2012, 138, S3-S14) que investiga los resultados de incumplimiento han demostrado que paciente con esquizofrenia que no toma su medicación como está prescrita tienen mayores índices de recaída, ingreso hospitalario y suicidio así como una mayor mortalidad. Se estima que del 40 al 75% de pacientes con esquizofrenia tiene dificultades para cumplir un régimen de tratamiento oral diario (Lieberman, J. A; Stroup, T. S.; McEvoy, J. P.; Swartz, M. S.; Rosenheck, R. A.; Perkins, D. O.; Keefe; R. S. E.; Davis, S. M.; Davis, C. E.; Lebowitz, B. D.; Severe, J.; Hsiao, J. K. "Efectividad de Fármacos Antipsicóticos en Pacientes con Esquizofrenia Crónica" Revista de Nueva Inglaterra de Medicina 2005, 353(12), 1209-1223). La monitorización terapéutica de fármacos (MTF) es la cuantificación de concentraciones de suero o plasma en fármacos, incluyendo fármacos antipsicóticos, para controlar y optimizar el tratamiento. Tal monitorización permite, por ejemplo, la identificación de paciente que no está cumpliendo su régimen de medicación, que no están consiguiendo dosis terapéuticas, que no responden a dosis terapéuticas, que tiene tolerabilidad sub-óptima, que tiene interacciones farmacocinéticas fármaco-fármaco, o que tienen un metabolismo anormal dando como resultado una concentración inapropiada de plasma. Existe variabilidad individual considerable en la habilidad del paciente para absorber, distribuir, metabolizar y excretar fármacos antipsicóticos. Tales diferencias pueden estar provocadas por enfermedad simultánea, edad, medicación simultánea o peculiaridades genéticas. Las diferentes formulaciones del fármaco también pueden tener influencia en el metabolismo de fármacos anti-psicóticos. MTF permite una optimización de dosis para pacientes individuales, mejorando los resultados terapéuticos y funcionales. MTF permite además que un médico asegure el cumplimiento con dosis prescritas y consiga concentraciones efectivas de suero.

Hasta la fecha, los métodos para determinar los niveles de concentraciones de suero o plasma de fármacos antipsicóticos incluyen el uso de cromatografía líquida (CL) con UV o detección de espectrometría de masas y radioinmunoensayos (véase, por ejemplo, Woestenborghs et al., 1990, "En la selectividad de algunos RIAs recientemente desarrollados" en Encuentas Metodológicas en Bioquímica y Análisis 20:241-246. Análisis de Fármacos y Metabolitos, incluyendo Agentes Anti-infecciosos; Heykants et al.,1994 "La Farmacocinética de Risperidona en Humanos: Un resumen", J Clin Psychiatry 55/4, supl: 13-17; Huang et al., 1993 "Farmcocinética del agente antipsicótico nuevo risperidona y la respuesta de prolactina en sujetos sanos", Clin Pharmacol Ther 54:257-268). Los radioinmunoensayos detectan uno o ambas de risperidona y paliperidona. Salamone et al. en la patente de Estados Unidos Nº 8.088.594 desvela un inmunoensayo competitivo para risperidona que usa anticuerpos que detectan tanto risperidona como paliperidona pero no metabolitos farmacológicamente inactivos. Los anticuerpos usados en el inmunoensayo competitivos se desarrollan contra un inmunógeno particular. ID Labs Inc. (London, Ontario, Canadá) comercializa un ELISA para olanzapina, otro fármaco antipsicóticos que también utiliza un formato competitivo. Las instrucciones de uso indican que el ensayo está diseñado para fines de selección y pretende un uso forense o de investigación, y no pretende específicamente un uso terapéutico. Las instrucciones recomiendan que todas las muestras positivas deberían confirmarse con cromatografía de gas/espectrometría de masa (GC-MS) e indican que el anticuerpo usado detecta olanzapina y clozapina (véase ID Labs Inc. "Hoja de datos de instrucciones de uso IDEL-F083", Fecha de Revisión de 8 de agosto, 2011). Algunos de estos métodos, concretamente HPLC y GC/MS pueden ser caros y arduos, y generalmente sólo se realizan en laboratorios grandes o especializados que tengan el equipo apropiado.

Existe una necesidad de otros métodos para determinar los niveles de fármacos antipsicóticos, en particular métodos que puedan realizarse en la consulta de un médico (donde le tratamiento para un paciente individual pueda ajustarse como corresponda de una manera más oportuna) y en otros escenarios médicos que carezcan de equipo de LC o GC/MS o que requieran resultados de pruebas rápidas.

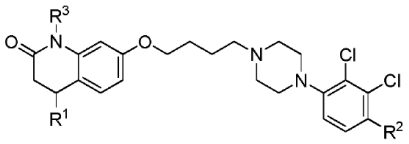
Aripiprazol es:



Resumen de la invención

La invención objeto proporciona compuestos y conjugados que permiten un método mejorado para determinar los niveles del fármaco antipsicótico aripiprazol:

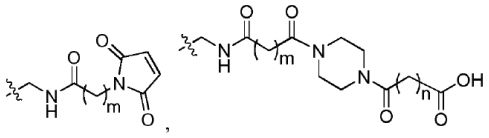
La invención comprende compuestos de la Fórmula I:



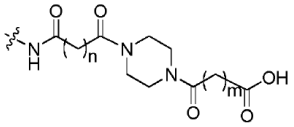
Fórmula I

donde

R^1 es H,



CH_2NH_2, $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H,



NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^3 es H; siempre y cuando dos de R^1, R^2, R^3 sean H, y además siempre y cuando R^1, R^2, R^3 no sean todos H simultáneamente;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

La invención comprende conjugados y compuestos de la invención con transportadores inmunogénicos como proteínas, y productos producidos por el proceso de contactar los compuestos de la invención con transportadores inmunogénicos.

Breve descripción de los dibujos

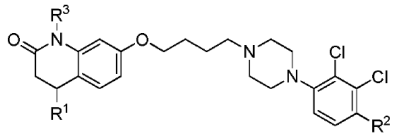
La Fig. 1 muestra resultados de ELISA competitivo generado con hibridoma 3C1;
La Fig. 2 muestra resultados de ELISA competitivo generado con hibridoma 3D7;
La Fig. 3 muestra el formato de inmunoensayo competitivo usado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral; y
Las Figs. 4 y 5 muestran los resultados generados con clon de aripiprazol de anticuerpo de captura 5C7 en el dispositivo de ensayo de flujo lateral.

Descripción detallada de la invención

La invención objeto proporciona compuesto y conjugados que permiten la determinación de niveles de fármacos antipsicóticos. Tales métodos permitirán a los médicos evaluar objetivamente en una cita cuantas posibilidades hay de que los síntomas del paciente empeoren debido a la falta de cumplimiento. Alternativamente, si está conforme, el médico puede considerar una elección diferente de tratamiento. La monitorización terapéutica de fármacos, que tales métodos permiten, es clave en la identificación de la mayoría de las opciones de tratamiento efectivo. Además, los médicos creen que tal MTF les ayudará a moverse en una relación muy diferente con sus pacientes, esto es, a moverse desde una discusión hipotética sobre no cumplimiento del tratamiento hacia una más colaborativa involucrando a los paciente tomen la responsabilidad activamente en la optimización de su régimen de tratamiento.

El desarrollo del método requiere primero la síntesis de varios inmunógenos, que comprende un hapteno sintético unido a una proteína. Un hapteno es una molécula pequeña que puede obtener una respuesta inmune cuando se une a un transportador grande como una proteína. Hay sustancias libres de proteínas, la mayoría de bajo peso molecular, que no son capaces solas de estimular la formación de anticuerpos, pero que reaccionan con anticuerpos. Un conjugado hapteno-anticuerpo es capaz de estimular la producción de anticuerpos. La generación específica de anticuerpos contra moléculas pequeñas es útil para el desarrollo de inmunoensayos (Pharm Rs. 1992, 9(11):1375-9, Annali Dell'istituto Superiore di Sanita. 1991, 27(1):167-74, Annali Dell'istituto Superiore di Sanita. 1991, 27(1):149-54, Immunology Letters. 1991, 28(1):79-83).

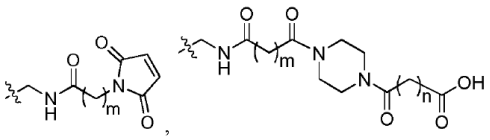
La invención comprende compuestos de la Fórmula I:



Fórmula I

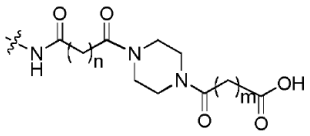
donde:

R^1 es H,



CH_2NH_2, $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

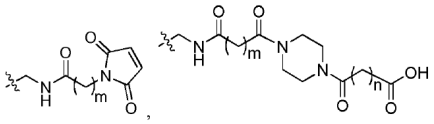
R^2 es H,



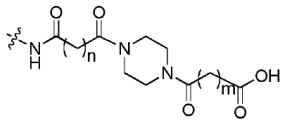
NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^3 es H; siempre y cuando dos de R^1, R^2, R^3 sean H, y además siempre y cuando R^1, R^2, R^3 no sean todos H simultáneamente;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

Otra realización de la invención comprende compuestos de la Fórmula I:

R^1 es H,



CH_2NH_2, $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H,

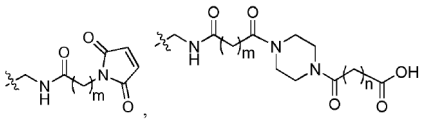


NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^3 es H; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

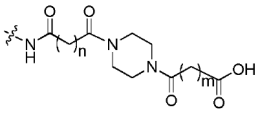
También aquí se describen compuestos de la Fórmula I:
donde:
R1 es H, o CH_2NH-$(Y)_p$-G;
R2 es H, o NH-$(Y)_p$-G;
R^3 es H; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
donde:
Y es un grupo separador orgánico;
G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
p es 1.

Otra realización de la invención comprende compuestos de la Fórmula I:
donde:

R^1 es H,



CH_2NH_2, o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

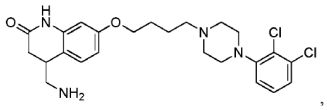


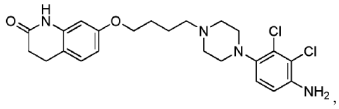
R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

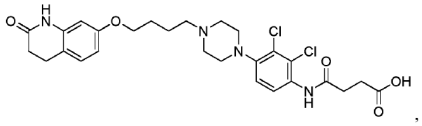
En otra realización de la invención:
R^1 es H, CH_2NH_2, o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$; R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 1, 2 o 3;
n es 1, 2 o 3.

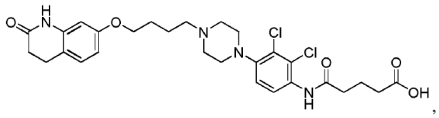
En otra realización de la invención:
R^1 es H, CH_2NH_2, o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 2;
n es 2.

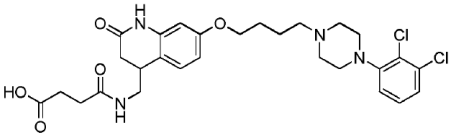
Otra realización de la invención es un compuesto seleccionado del grupo consistente en:

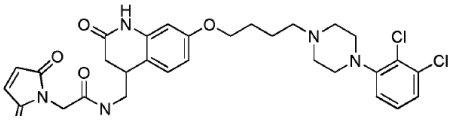

,


,

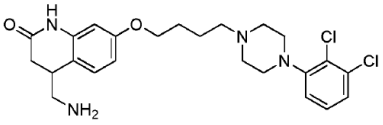

,


,

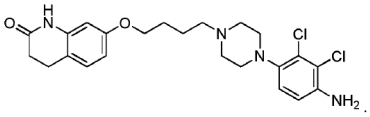
, y 



Una realización preferente de la invención es el compuesto:

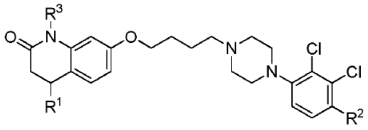

.

Otra realización preferente de la invención es el compuesto:


.

La invención proporciona además conjugados de los compuestos anteriores con un transportador inmunogénico.

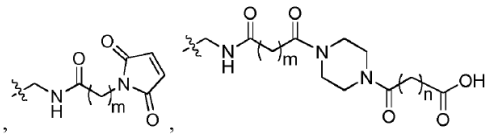
Otra realización de la invención es por lo tanto un compuesto de la Fórmula 1



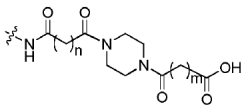
Fórmula I

donde:

R^1 es H,



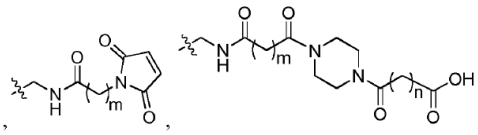
CH_2NH_2, $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H,



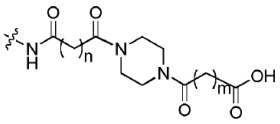
NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^3 es H; siempre y cuando dos de R^1, R^2, R^3 sean H, y además siempre y cuando R^1, R^2, R^3 no sean todos H simultáneamente;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5; y un transportador inmunogénico.

Otra realización de la invención es un conjugado del compuesto de la Fórmula 1 donde:

R^1 es H,



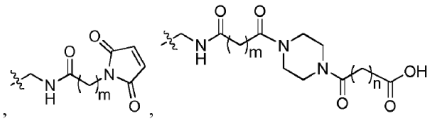
CH_2NH_2,$CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H,



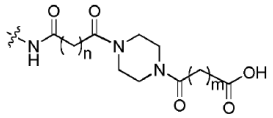
NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5; y un transportador inmunogénico.

También aquí se describen compuestos de la Fórmula I:
donde:
R^1 es H, o CH_2NH-$(Y)_p$-G;
R^2 es H, o NH-$(Y)_p$-G;
R^3 es H; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
donde:
Y es un grupo separador orgánico;
G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
p es 1; y un transportador inmunogénico.

Otra realización de la invención es un conjugado del compuesto de la Fórmula 1 donde:
R^1 es H,



CH_2NH_2, $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H,



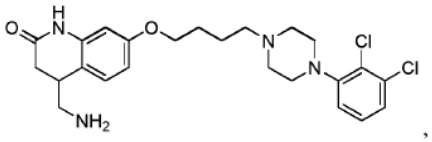
NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5; y un transportador inmunogénico.

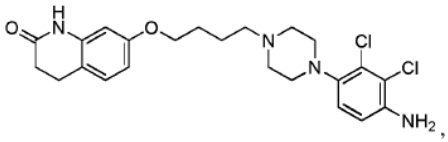
Otra realización de la invención es un conjugado del compuesto de la Fórmula 1 donde:
R^1 es H, CH_2NH_2 o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

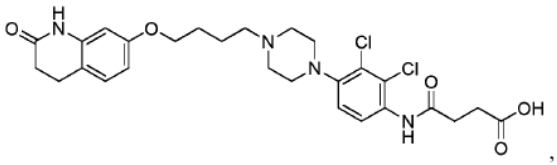
R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
m es 1, 2 o 3;
n es 1, 2 o 3; y un transportador inmunogénico.

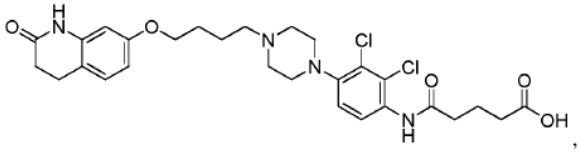
Otra realización de la invención es un conjugado del compuesto de la Fórmula 1 donde:
R^1 es H, CH_2NH_2 o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
m es 2;
n es 2; y un transportador inmunogénico.

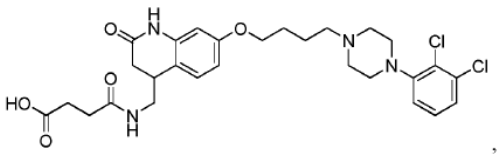
Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo consistente en:



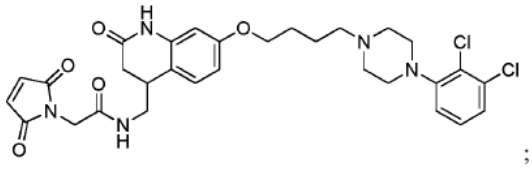








y



;

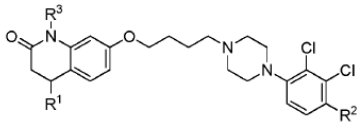
y un transportador inmunogénico.

Una realización preferente de la invención es cualquiera de los conjugados anteriores donde el transportador inmunogénico es una proteína.

Una realización preferente de la invención es cualquiera de los conjugados anteriores, donde dicha proteína es hemocianina modificada de lapa, ovoalbúmina o tiroglobulina bovina.

La invención también proporciona productos formados a partir del proceso de poner en contacto los compuestos anteriores con un transportador inmunogénico.

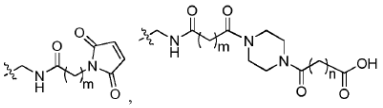
Otra realización de la invención es por lo tanto un producto formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I



Fórmula I

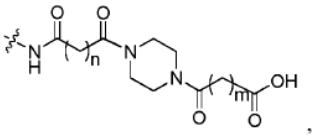
donde:

R^1 es H,



CH_2NH_2, $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

R^2 es H,



NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

R^3 es H; siempre y cuando dos de R^1, R^2, R^3 sean H, y además siempre y cuando R^1, R^2, R^3 no sean todos H simultáneamente;

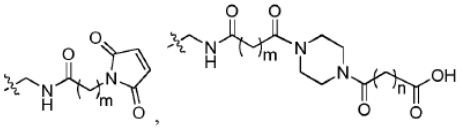
m es 1, 2, 3, 4 o 5;

n es 1, 2, 3, 4 o 5; con un transportador inmunogénico.

Otra realización de la invención es un producto formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I

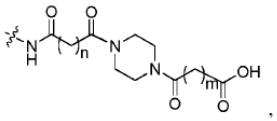
donde:

R^1 es H,



CH_2NH_2, $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

R^2 es H,



NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5; con un transportador inmunogénico.

También aquí se describe un producto formado a partir del proceso de contactar un compuesto de la Fórmula I

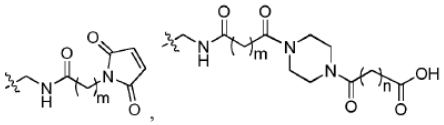
donde:

R^1 es H, o CH_2NH-$(Y)_p$-G;
R^2 es H, o NH-$(Y)_p$-G;
R^3 es H; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;

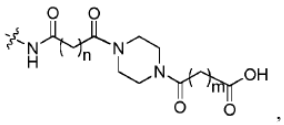
donde:

Y es un grupo separador orgánico;
G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
p es 1; con un transportador inmunogénico.

Otra realización de la invención es un producto formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I
donde:
R^1 es H,



CH_2NH_2, $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H,



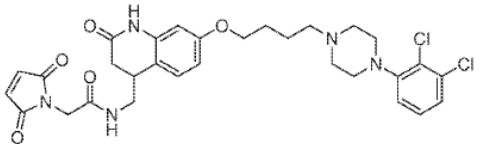
NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5; con un transportador inmunogénico.

Otra realización de la invención es un producto formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I
donde:
R^1 es H,CH_2NH_2 o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
m es 1, 2 o 3;
n es 1, 2 o 3; con un transportador inmunogénico.

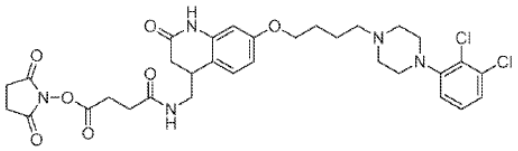
Otra realización de la invención es un producto formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I
donde:
R^1 es H,CH_2NH_2 o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
m es 2;
n es 2; con un transportador inmunogénico.

Una realización preferente de la invención es un producto formado a partir del proceso de poner en contacto el compuesto



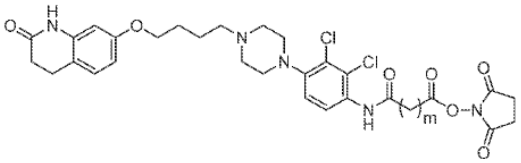
con un transportador inmunogénico.

Una realización preferente de la invención es un producto formado a partir del proceso de poner en contacto el compuesto



con un transportador inmunogénico.

Una realización preferente de la invención es un producto formado a partir del proceso de poner en contacto el compuesto



donde m es 2 o 3; con un transportador inmunogénico.

Una realización preferente de la invención es cualquiera de los productos anteriores donde el transportador inmunogénico es una proteína.

Una realización preferente de la invención es cualquiera de los productos anteriores, donde dicha proteína es hemocianina modificada de lapa, ovoalbúmina o tiroglobulina bovina.

Abreviaturas

Aquí y a lo largo de la solicitud, pueden usarse las siguientes abreviaturas:

AIBN	azobisisobutironitrilo
AMAS	N-(α-maleimidoacetoxi)succinimida éster
BTG	tiroglobulina bovina
Bu_3N	tributilamina
DMF	N,N-dimetilformadida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	alcohol etílico
KLH	hemocianina modificada de lapa
NBS	N-bromosuccinimida
SATA	N-succinimidil S-acetiltioacetato
THF	tetrahidrofurano
TFA	ácido trifluoroacético
DCC	diciclohexilcarbodiimida

DIC	diisopropilcarbodiimida
DMAP	N,N-dimetil-4-aminopiridina
EDC	1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimidahidrocloruro
NHS	N-hidroxisuccinimida
TFP	tetrafluorofenilo
PNP	p-nitrofenil
TBTU	O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato
HOBT	N-Hidroxibenzotriazol
DEPBT	3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-uno
BOP-Cl	Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)cloruro fosfónico
DTT	ditioeritritol

Definiciones

El término "conjugado" se refiere a cualquier sustancia formada a partir de unir partes separadas. Los conjugados representativos de acuerdo con la presente invención incluyen aquellos formados al unir una molécula pequeña, como los compuestos de la Fórmula I, y una molécula grande, como un trasportador o un polímero de poliamida, particularmente una proteína. En el conjugado la molécula pequeña puede unirse en uno o más sitios activos en la molécula grande.

El término "hapteno" se refiere a un antígeno parcial o incompleto. Un hapteno es una sustancia libre de proteína, que no es capaz de estimular la formación de un anticuerpo, pero que reacciona con anticuerpos. Los anticuerpos se forman uniendo un hapteno con un transportador inmunogénico de alto peso molecular, y después inyectando el producto unido, esto es, un inmunógeno, a un sujeto humano o animal.

El término "inmunógeno" se refiere a una sustancia capaz de provocar, producir o generar una respuesta inmune en un organismo.

Un "transportador inmunogénico", como aquí se usa, es una sustancia inmunogénica, comúnmente una proteína, que puede unirse en una o más posiciones con haptenos, posibilitando así la producción de anticuerpos que pueden enlazarse específicamente con haptenos. Ejemplos de sustancias transportadoras inmunogénicas incluyen, aunque no se limitan a, proteínas, glicoproteínas, complejos poliamino-polisacáridos, partículas y ácidos nucleicos que se reconocen como extraños y por lo tanto provocan una respuesta inmunológica del huésped. Los poliamino-polisacáridos pueden prepararse a partir de polisacáridos usando cualquier medio convencional conocido para esta preparación.

Pueden emplearse varios tipos de proteínas como transportadores inmunogénicos, incluyendo sin limitación, albúminas, proteínas de suero, lipoproteínas, etc. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina de suero bovino, hemocianina modificada de lapa, ovoalbúmina de huevo, tiroglobulina bovina, albúmina de suero humano fracción V, albúmina de conejo, globulina de semilla de calabaza, toxoide de difteria, toxoide de tétanos, toxina botulínica, proteínas succiniladas, y poli(aminoácidos) sintéticos como polilisina.

Los transportadores inmunogénicos también pueden incluir amino-polisacáridos, que son polímeros de alto peso molecular formados por condensaciones repetidas de monosacáridos. Ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógenos, celulosa, gomas de carbohidrato como goma arábiga, goma agar y etcétera. El polisacárido también contiene residuos de poli(aminoácido) y/o residuos de lípido.

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

El transportador inmunogénico también puede incluir partículas sólidas. Las partículas tienen generalmente al menos aproximadamente 0,02 micrones (μm) y no más de aproximadamente 100 μm, y normalmente desde aproximadamente 0,05 μm a 10 μm de diámetro. La partícula puede ser orgánico o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, óptimamente de una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente desde aproximadamente 0,7 a 1,5 g/mL, y está compuesta por material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos como células y microorganismos, incluyendo ejemplos no limitativos como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, Estreptococo, Estafilococo áureo, E. coli y virus. Las partículas también pueden estar formadas por polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, látex, vesículas de fosfolípido o lipoproteínas.

El término "derivativo" se refiere a un compuesto químico o molécula hecha de un compuesto matriz mediante una o más reacciones químicas.

El término "análogo" de un compuesto químico se refiere a un compuesto químico que contiene una cadena de átomos de carbono y los mismos grupos funcionales particulares como un compuesto de referencia, pero la cadena de carbono del análogo es más larga o más corta que la del compuesto de referencia.

Una “etiqueta”, “molécula detectora”, “reportera” o “marcador detectable” es cualquier molécula que produce, o puede ser inducida para que produzca una señal detectable. La etiqueta puede conjugarse con un analito, inmunógeno, anticuerpo u otra molécula como un receptor o una molécula que puede enlazarse con un receptor como un ligando, particularmente un hapteno o anticuerpo. Ejemplos no limitativos de etiquetas incluyen isotopos radioactivos (por ejemplo, ^{125}I), enzimas (por ejemplo, β-galactosidasa, peroxidasa), fragmentos de enzima, sustratos de enzima, inhibidores de enzima, coenzimas, catalizadores, fluoróforos (por ejemplo, rodamina, isotiocianato de fluoresceína o FITC o Dylight 649), tintes, quimioluminiscentes y luminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, luciferina) o sensibilizadores.

Como aquí se usa, un “separador” se refiere a una parte de una estructura química que conecta dos o más subestructuras como haptenos, transportadores, inmunógenos, etiquetas o parejas de enlace por medio de un grupo de enlace funcional. Estos grupos separadores están compuestos por átomos típicamente presentes y montados en manera que se encuentra típicamente en compuestos orgánicos y por lo tanto son referidos como “grupos separadores orgánicos”. Los bloques químicos de construcciones usados para montar los separadores se describirán a partir de ahora en esta solicitud. Entre los separadores preferentes están las cadenas de carbono rectas o ramificadas, saturada o no saturadas. Estas cadenas de carbono también pueden incluir uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos sustituyendo uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o al final de la cadena. Por “heteroátomos” se entiende átomos diferentes al carbono que se eligen del grupo consistente en oxígeno, nitrógeno, fósforo y sulfuro, donde los átomos de nitrógeno, fósforo y sulfuro pueden existir en cualquier estado de oxidación y pueden tener carbono u otros heteroátomos unidos a ellos. El separador también puede incluir grupos cíclicos o aromáticos como partes de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos de la cadena.

El número de átomos en el grupo separador se determina contando los átomos diferentes a hidrógeno. El número de átomos en una cadena dentro de un grupo separador se determina contando el número de átomos diferentes a hidrógeno a lo largo de la ruta más corta entre las estructura que se están conectando. Las longitudes preferentes de cadena son entre 1 y 20 átomos.

Un “grupo de enlace funcional” se refiere a un grupo reactivo que está presente en un hapteno o puede usarse para proporcionar un sitio reactivo disponible al que la parte de hapteno puede unirse con otra fracción mediante la formación de un enlace químico covalente para producir un conjugado de un hapteno con otra fracción (como una etiqueta o un transportador). El hapteno puede unirse de esta manera con una fracción tal como biotina para formar una pareja competitiva de enlace para el hapteno.

Los grupos separadores pueden usase para unir el hapteno con el transportador. Los separadores de diferentes longitudes permiten unir el hapteno con diferentes distancias desde del transportador para presentación al sistema inmune del animal o humano que se está inmunizando para optimización del proceso de formación de anticuerpo. La unió a diferentes posiciones en la molécula de hapteno permite la oportunidad de presentar sitios específicos en el hapteno para el sistema inmune para influenciar en el reconocimiento del anticuerpo. El separador puede contener grupos solubilizadores hidrofílicos para hacer que el derivativo de haptenos sea más soluble en medio acuoso. Ejemplos de grupos solubilizadores hidrofílicos incluyen, aunque no se limitan a, grupos de polioxialquiloxi, por ejemplo, cadenas de glicol de polietileno; grupos de hidroxilo, carboxilato y sulfonato.

Los términos “grupo nucleofílico” o “nucleófilo” se refieren a una especie que dona un par de electrones para formar un enlace químico en una reacción. Los términos “grupo electrofílico” o “electrófilo” se refieren a una especie que acepta un par de electrones de un nucleófilo para formar un enlace químico en una reacción.

El término “sustituido” se refiere a una sustitución de un átomo o grupo de átomos en lugar de un átomo de hidrógeno o un átomo de carbono en cualquier posición en la molécula matriz. Ejemplos no limitativos de sustituyentes incluyen átomos de halógeno, grupos de amino, hidroxi, carboxi, alquilo, arilo, heteroalquilo, heteroarilo, ciano, alcoxi, nitro aldehído y cetona.

El término “alquilo” se refiere a radicales de cadena lineal o ramificada saturada o no saturada de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique lo contrario, y específicamente pretende incluir radicales que tienen cualquier grado o nivel de saturación. Alquilo incluyen, aunque no se limita a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, oetilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo y dodecilo.

El término “cicloalquilo” se refiere a un radical de anillo de hidrocarburo monocíclico o bicíclico saturado o parcialmente no saturado compuesto por 3 a 10 átomos de carbono. Los sustituyentes de alquilo pueden estar opcionalmente presentes en el anillo. Los ejemplos incluyen ciclopropilo, 1,1-diemtil ciclobutilo, 1,2,3-trimetilciclopentilo, ciclohexilo y ciclohexenilo.

El término “heteroátomo” se refiere a un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo fosforoso o un átomo de sulfuro donde los átomos de nitrógeno, fósforo y sulfuro y puede existir en cualquier estado de oxidación permitido.

El término “heteroalquilo” se refiere a un grupo alquilo que incluye uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos sustituyendo uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena o al final de las cadenas.

El término “heterocíclico” se refiere a un anillo no aromático (esto es, saturado o parcialmente no saturado) compuesto por 3 a 7 átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado de N, O u S. Los sustituyentes de alquilo pueden estar presentes opcionalmente en el anillo. Ejemplos incluyen tetrahidrofurilo, dihidropiranilo, piperidilo, 2,5-dimetipiperidilo, morfolinilo, piperacinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, imidazolidinilo e imidazolinilo.

El término “hidroxialquilo” se refiere al menos a un grupo hidroxilo unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

El término “alcoxi” se refiere a radicales de cadena recta o ramificada de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique lo contrario, enlazados a un átomo de oxígeno. Los ejemplos incluyen, aunque no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi y butoxi.

El término “alcoxialquilo” se refiere al menos a un grupo alcoxi unido a cualquier átomo de carbono a lo largo una cadena de alquilo.

El término “polialcoxialquilo” se refiere a compuestos alcoxi de cadena larga e incluye glicoles de polietileno de tamaños discretos y monodispersos.

El término “tioalquilo” se refiere al menos a un grupo de sulfuro enlazado a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo. El grupo de sulfuro puede estar en cualquier estado de oxidación e incluye sulfóxidos, sulfonas y sulfatos.

El término “carboxialquilo” se refiere al menos a un grupo carboxilato enlazado a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo. El término “grupo carboxilato” incluye ácidos carboxílicos y ésteres de alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo carboxilatos.

El término “alquilcarbonilo” se refiere a un grupo que tiene un grupo carbonilo enlazado a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

El término “heteroarilo” se refiere a radicales de anillo aromáticos monocíclicos de 5 a 7 miembros o bicíclicos de 8 a 10 miembros, cuyo anillo puede consistir en de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O u S donde los átomos de nitrógeno y sulfuro pueden existir en cualquier estado de oxidación permitida. Ejemplos incluyen bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzotienilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, piracinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolinilo, tiazolilo y tienilo.

El término “arilo” se refiere a radicales de anillo aromático monocíclicos o bicícliclos que contienen de 6 a 12 carbonos en el anillo. Los sustituyentes de alquilo pueden estar opcionalmente presentes en el anillo. Los ejemplos incluyen fenilo, bifenilo y naftaleno.

El término “aralquilo” se refiere a un grupo alquilo C_{1-6} que contiene un sustituyente de arilo. Ejemplos incluyen bencilo, feniletilo o 2-naftilmetilo.

El término “acilo” se refiere al grupo $–C(O)R_a$, donde R_a es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, arilo, aralquilo y heteroarilo. Un “agente acilante” añade el grupo $–C(O)R_a$ a una molécula.

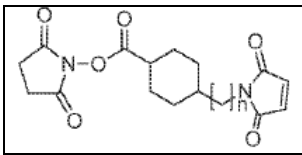
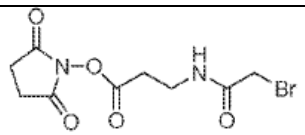
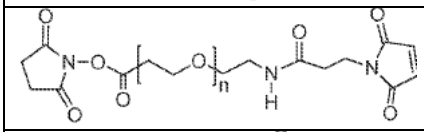
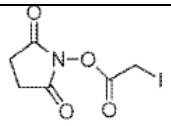
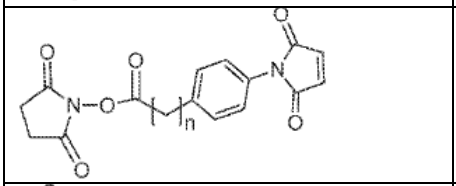
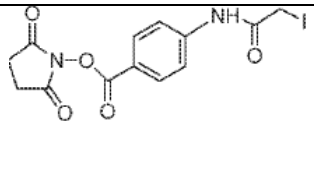
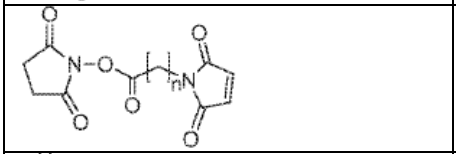
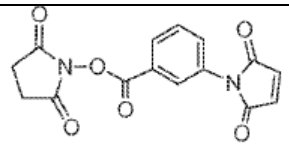
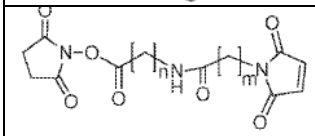
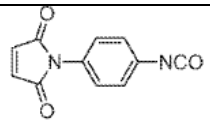
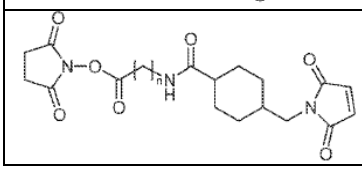
El término “sulfonilo” se refiere al grupo $–C(O)_2R_b$, donde R_b es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, haloalquilo, arilo, aralquilo y heteroarilo. Un “agente sulfonilante” añade el grupo $–C(O)_2R_a$ a una molécula.

Los separadores que tienen grupos funcionales de enlace reactivos para la unió de haptenos con fracciones transportadoras pueden prepararse mediante una amplia variedad de métodos. El separador puede formarse usando una molécula que funciona o se activa de manera diferenciada con grupos en cualquier extremo para permitir la reacción secuencial selectiva con el hapteno y el transportador, pero la misma fracción reactiva puede también usarse en ambos extremos. Los grupos seleccionados para reacción con el hapteno y el grupo funcional de enlace pueden estar unidos al transportador y determinarse mediante el tipo de funcionalidad en el hapteno y el transportador al que el hapteno está unido. Los separadores y métodos de unión con haptenos y transportadores incluyen, aunque no se limitan a, aquellos descritos en Brinkley, M. A., Bioconjugate Chem. 1992, 3:2-13,

Hermanson, Greg. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Londres, Amsterdam, Burlington, MA, USA, 2008 y Thermo Scientific Pirece Crosslinking Technical Handbook; disponible para descargar o solicitud de copia en papel en Thermo Scientific 3747 N Meridian Rd, Rockford, IL USA 61101, ph 800-874-3723 o en: http://www.piercenet.com/ y referencias en ella. Muchas moléculas activadas de manera diferenciada para la formación de grupos separadores están disponibles en el mercado por parte de vendedores, por ejemplo Thermo Scientific.

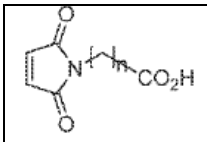
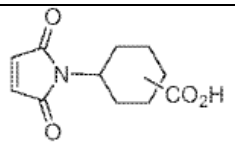
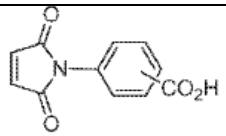
Para haptenos que tienen un grupo amino, los modos de unión del separador con el hapteno incluyen la reacción de la amina en el hapteno con un bloque de construcción separador que tiene un éster de haluro acilo o activo. Los "ésteres activos" se definen como ésteres que se someten a reacción con un grupo nucleofílico, por ejemplo un grupo amino, bajo condiciones suaves para formar un enlace estable. Un enlace estable se define como un que permanece intacto bajo condiciones de más uso, por ejemplo, posteriores etapas sintéticas, uso como un inmunógeno o en un ensayo biolquímico. Un ejemplo preferente de un enlace estable es un enlace amida. Lo ésteres activos y métodos de formación se describen en Benoiton, N. L, en Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry, Thieme Stuttgart, Nueva York, vol E22, sección 3.2:443 y Benoiton, N. L. Chemistry of Peptide Synthesis, Taylor y Francis, NY, 2006. Los ésteres activos preferentes incluyen éster p-nitrofenilo (PNP), éster N-hidroxisuccinimida (NHS) y éster tetrafluorofenilo (TFP). Los haluros de acilo pueden prepararse mediante muchos métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo reacción del ácido carboxílico con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, véase: Fieser, L. F. y Fieser, M. Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons, NY; 1967 y referencias en ella. Estos pueden convertirse en otros ésteres activos como ésteres de p-nitrofenilo (PNP) que también pueden usarse en separadores bi-funcionalesl como se describe en Wu et al., Organic Letters, 2004, 6 (24):4407. Los ésteres de hidroxisuccinimida (NHS) pueden prepararse mediante reacción de N,N-disuccinimidil carbonato (CAS 74124-79-1) con el ácido carboxílico de un compuesto en presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiletilamina en un disolvente aprótico bajo condiciones anhidras como se describe en el ejemplo 35 de WO2012012595 o usando N-hidroxisuccinimida y diciclohexilcarbodiimida (DCC) u otro agente deshidratante, bajo condiciones anhidras. Pueden prepararse ésteres de tetrafluorofenilo (TFP) mediante reacción de ácidos carboxílicos con 2,3,5,6-tetrafluorofeniltrifluoroacetato en presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiletilamina en un disolvente aprótico bajo condiciones anhidras como se presenta en Wiblbur, et al., Bioconjugate Chem., 2004, 15(1):203. Un experto en la técnica reconocerá que los separadores mostrados en la Tabla 1, entre otros, pueden obtenerse usando métodos y unirse a haptenos con amino utilizando optimización rutinaria de condiciones de reacción. Estos separadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un transportador.

Tabla 1

	
	
	
	
	
	Los valores razonables para m y n son entre 1 y 10

La unión directa de la amina en el hapteno y una funcionalidad de ácido carboxílico en el bloque de construcción separador en presencia de un agente de unión puede también usare como un modo de adhesión. Los reactivos preferentes son aquellos típicamente usados en síntesis peptídica. Los reactivos de unión peptídica incluyen, aunque no se limitan a, O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrfluoroborato (TBTU, CAS # 125700-67-6), véase: Prush, S. Org. Process. Res. Dev. 2006, 10:441; N-Hidroxibenzotriazol (HOBT, CAS #2592-95-2) con un agente deshidratante de carbodiimida, por ejemplo, N-N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisoopropilcarbodiimida (DIC) o 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimidahidrocloruro (EDC), véase: König W., Geiger, R. Chem. Ver., 1070, 103 (3):788; 3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-uno (DEPBT, CAS#165534-43-0), véase: Liu, H. et al., Chinese Chemical Letters, 2002, 13(7):601; Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)cloruro fosfónic; (BOP-Cl, CAS#68641-49-6); véase: Diago-Mesegur, J et al., Synthesis, 1980, 7:547-51 y otros descritos con detalle por Benoiton en Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005, Capítulo 2 y la revista técnica proporcionada por Advanced Automated Peptide Protein Technologies (aapptec), 6309 Shepardsville Rd., Louisville KY 40228, ph 888 692 9111; www.aapptec.com, y referencia en ella. Estos métodos crean un enlace de amida estable que une el hapteno con el separador. Ejemplos de separadores que pueden obtenerse usando métodos conocidos y unirse a los haptenos con amino que utilizan optimización rutinaria de condiciones de reacción empleando los métodos descritos y citados anteriormente se muestran, aunque no se limitan a, los de la Tabla 2. Estos separadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un separador.

Tabla 2

 Rango razonable para n es entre 1-10		

Los separadores también pueden construirse de una manera de etapas para unión secuencial de grupos químicos apropiados al hapteno incluyen la etapa de formar el grupo de enlace funcional que es capaz de unirse al transportador. Véase los ejemplos ilustrativos bajo los Esquemas Generales de Reacción.

Además, cuando el hapteno tiene un grupo nucleofílico, por ejemplo, un grupo tiol, un grupo amino o un grupo hidroxilo que se convertirá en el punto de unión del separador, el separador también puede construirse mediante alquilación del tiol, amina o grupo hidroxilo. Cualquier grupo alquilo que se sustituya apropiadamente por una fracción capaz de someterse a una reacción de sustitución, por ejemplo, un haluro de alquilo o un éster ácido sulfónico como p-Toluenosulfonato, puede usarse para unirse al separador. El experto en la técnica conoce muchos ejemplos de reacción de alquilación y pueden encontrarse ejemplos específicos en la bibliografía química general y optimizarse a través de experimentación rutinaria. Una exposición de reacciones de alquilación con muchas referencias pueden encontrarse en el Capítulo 10 de March's Advanced Organic Chemistry, Smith, M. B., y March. ,J., John Wiley & Sons, Inc., NY, 2001. También pueden usarse otros enlaces como reacción de la fracción nucleofílica, por ejemplo una amina, en el hapteno con un isocianato para formar una urea o reacción con un isotiocianato para formar un enlace tiourea, véase: Li, Z., et al., Phosphorous, Sulfur and Silicon and the Related Elements, 2003, 178(2):293-297. Los separadores pueden unirse a haptenos con grupos hidroxilos mediante reacción con grupos de isocianato para formar enlaces de carbamato o uretano. El separador puede activarse de manera diferenciada con el grupo funcional de isocianato en un extremo y un grupo de enlace funcional capaz de reaccionar con el transportador, véase: Annunziato, M. E., Patel, U.S., Ranade, M. y Palumbo, P. S. Bioconjugate Chem., 1993, 4:212-218.

Para haptenos que tienen un grupo de ácido carboxílico, los modos de unión de una parte espaciadora al hapteno incluyen la activación del grupo de ácido carboxílico como un haluro de acilo o éster activo, cuyos ejemplos se muestran en la Tabla 3, cuya preparación se ha descrito previamente, seguido de reacción con un amino ($-NH_2-$), hidrazino ($-NH-NH_2-$), hidrazido ($-C(O)-NH-NH_2-$) o grupo hidroxilo (-OH) en la parte espaciadora para formar una amida, hidrazida, diacilhidrazina o enlace de éster; o unión directa del grupo de ácido carboxílico con un grupo amino en la parte espaciadora o directamente en el transportador con un reactivo de enlace peptídico y/o un reactivo deshidratante de carbodiimida, descrito previamente, cuyos ejemplos se muestran en las Tablas 4 y 5. Pueden emplearse los procedimientos en referencias citadas previamente para la formación de ésteres activados y uso de agentes de enlace peptídico para la unión de haptenos que tienen ácido carboxílico con bloques de construcción separadores y transportadores de proteínas con grupos amino disponibles que utilizan optimización rutinaria de condiciones de reacción.

Tabla 3

Sulfo NHS y NHS	TFP	Cloruro de acilo	PNP

Tabla 4

HOBT	DEPT	BOP-Cl	TBTU

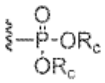
Tabla 5

Diisopropilcarbodiimida (DIC)	Diciclohexilcarbodiimida (DCC)	1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. HLC (EDC)

Otros grupos electrofílicos pueden estar presenten en el hapteno para unirse al separador, por ejemplo, u haluro de sulfonilo

O un grupo fosforoso electrofílico, por ejemplo:

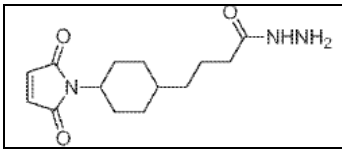
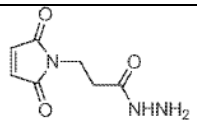
Véase: Malachowski, William P., Coward, James K., Journal of Organic Chemistry, 1994, 59 (25):7616, o



R_c es alquilo, cicloalqulo, arilo, arilo sustituido, aralquilo.
Véase: Aliouane, L., et al., Tetrahdron Letters, 2011, 52(28):8681.

Los haptenos que tienen grupos de aldheído o cetona pueden estar unidos a separadores usando métodos que inlcuyen, aunque no se limitan a, reacción con un grupo de hidrazida N_2N-NH-C(O)-en el separador para formar un acilhidrazona, véase: Chamow. S. M., Kogan, T. P., Peers, D. H. Hastings, R. C., Byrn, R. A. y Askenazxi, A. J. Biol. Chem. 1992, 267(22): 15916. En la Tabla 6 se muestran ejemplos de grupos de separador de hidrazida bifuncional que permiten la unión a un grupo tiol en el transportador.

Tabla 6

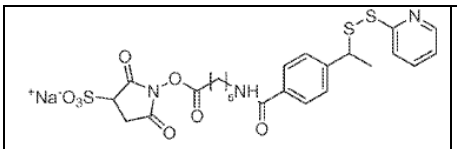
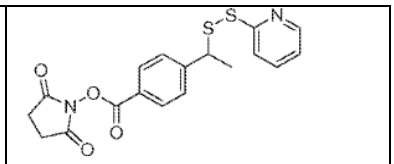
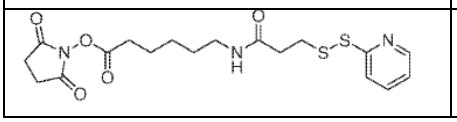
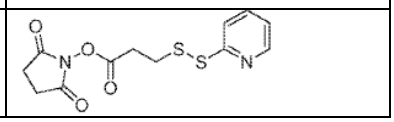
	

Los haptenos también pueden contener grupos tiol que pueden reaccionar con el transportador siempre y cuando el transportador se haya modificado para proporcionar un grupo que pueda reaccionar con el tiol. Los grupos transportadores pueden modificarse mediante métodos que incluyen, aunque no se limitan a, unión de un grupo que contiene un grupo funcional de maleimida mediante reacción de un grupo amino en el transportador con N-Succinimidil maleimidoacetato, (AMAS, CAS#55750-61-3), Succinimidil iodoacetato (CAS# 151199-81-4), o cualquiera de los grupos separadores bifuncionalese mostrados en la Tabla 1 para introducir un grupo que pueda someterse a reacción dando como resultado una unión del hapteno con el transportador.

El grupo de enlace funcional capaz de formar un enlace con el transportador puede ser cualquier grupo capaz de formar un enlace estable y puede ser reactivo a un número de diferentes grupos en el transportador. El grupo de enlace funcional puede reaccionar preferentemente con un grupo amino, un grupo de ácido carboxílico o un grupo tiol en el transportador, o derivativo del mismo. Los ejemplos no limitativos del grupo de enlace funcional son un grupo de ácido carboxílico, haluro de acilo, éter activo (como se ha definido previamente), isocianato, isotiocianato, haluro de alquilo, grupo amino, grupo tiol, grupo de maleimida, grupo de acrilato (H_2C=CH-C(O)-) o grupo de vinilo sulfona H_2C=CH-SO_2-) Véase: Park, J. W. et al., Bioconjugate Chem., 2012, 23(3): 350. El grupo de enlace funcional puede estar presente como parte de un bloque de construcción separador activado de manera diferencial que puede reaccionar en forma de etapas con el hapteno y el derivativo resultante de hapteno puede reaccionar con el transportador. Alternativamente, el hapteno puede derivarse con un separador que tiene un grupo precursor que puede transformase en el grupo de enlace funcional mediante una reacción posterior. Cuando el grupo de enlace funcional en el separador es una amina o un grupo de ácido carboxílico, la reacción de unión con el grupo de ácido carboxílico o amina en el transportador puede realizarse directamente a través del uso de reactivos de agente peptídico de acuerdo con procedimientos en la referencias citadas anteriormente para estos reactivos.

Los grupos de disulfuro particulares, por ejemplo, piridilsulfuro, pueden usarse como el grupo de enlace funcional en el separador que puede someterse a intercambio con un grupo tiol en el transportador para formar un enlace de disulfuro mezclado, véase: Ghetie, V., et al., Bionconjugate Chem., 1990, 1:24-31. Estos separadores pueden unirse mediante reacción al hapteno que tiene amina con un éster activo que se une a un separador que tiene el grupo de piridilsulfuro, cuyos ejemplos incluyen, aunque no se limitan a, aquellos mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7

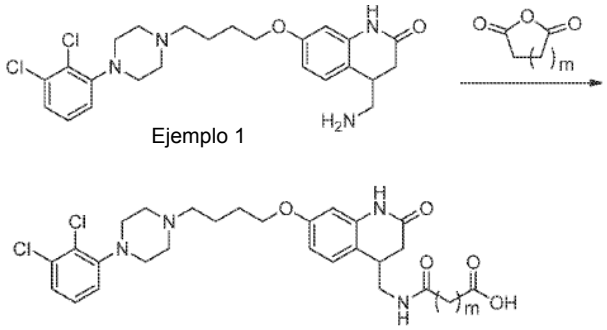
	
	

La mayoría de las veces el transportador es una proteína los grupos ε-amino de los residuos de lisina pueden usarse para unión, bien directamente mediante reacción con un grupo de enlace funcional reactivo con amina o después de derivatización con un grupo que contiene tiol, incluyendo N-Succinimidil S-Acetiltioacetato, (SATA, CAS 76931-93-6), o un análogo del mismo, seguido de división del grupo acetato con hidroxilamina para exponer el grupo tiol para reacción con el grupo de enlace funcional en el hapteno. Los grupos tiol pueden también introducirse en el transportador mediante reducción de enlaces de disulfuro en los transportadores de proteína con reactivos reductores suaves que incluyen, aunque no se limitan a, 2-mercaptoetilamina, véase: Bilah, M., et al., Bioelectrochemistry, 2010, 80(1):49, reactivos de fosfino, véase: Kirley, T. L., Analytical Biochemistry, 1989, 180(2):231 o ditioeritritol (DTT, CAS 3483-12-3) Cleland, W. Biochemistry, 1964, 3:480-482.

Esquemas generales de reacción

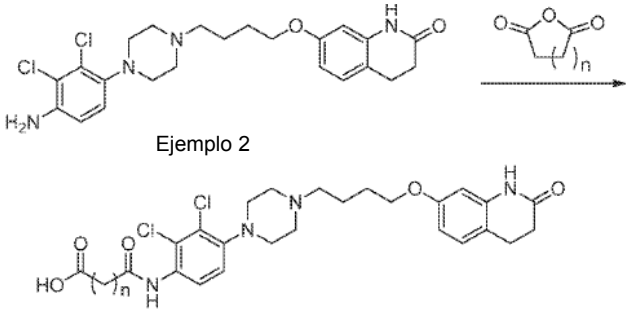
Los compuestos representativos de la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos sintéticos generales descritos más abajo. Los compuestos de la Fórmula I pueden prepararse mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los siguientes esquemas de reacción solamente pretenden representar ejemplos de la invención y no pretende de ninguna manera limitar la invención.

Esquema 1



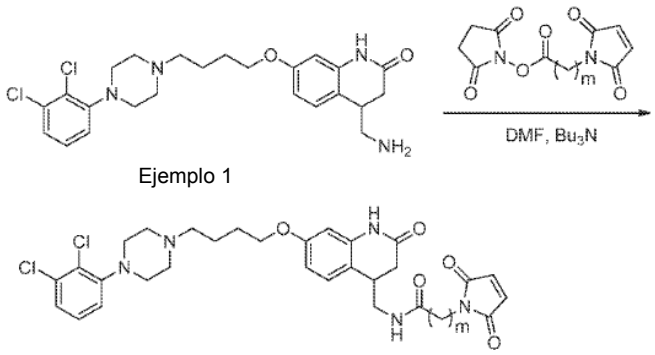
El hapteno del Ejemplo 1 pude elaborarse con separadores mediante reacción con un compuesto anhidro cíclico, como anhídrido succínico o anhídrido glutárico, como se muestra en el Esquema 1. La reacción puede realizarse en un disolvente tal como THF, a temperatura ambiente, durante la noche.

Esquema 2



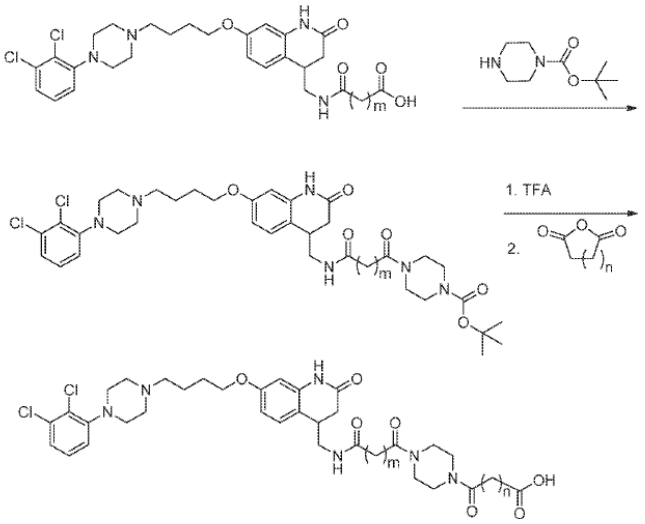
El hapteno del Ejemplo 2 puede elaborarse con separadores mediante reacción con un compuesto anhidro cíclico, como anhídrido succínico o anhídrido glutárico, como se muestra en el Esquema 2. La reacción puede realizarse en un disolvente tal como piridina, y calentarse hasta aproximadamente 110ºC en un horno microondas durante 3-6 horas.

Esquema 3

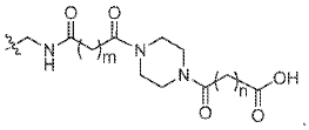


Los haptenos que terminan en un grupo de alquilo amina, como el Ejemplo 1, pueden además funcionar con un grupo de maleimida. Aquellos expertos en la técnica reconocerán que la misma metodología será aplicable a otros derivados de alquilamino de aripiprazol. La reacción de la amina derivada de aripiprazol con el grupo que hace funcionar alquil-maleimida, como 2,5-dioxopirrolidina-1-il 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato, en un disolvente tal como DMF, en presencia de una base, tal como tributil amina, a 20 ºC, durante una hora genera haptenos de aripiprazol con un separador de maleimida.

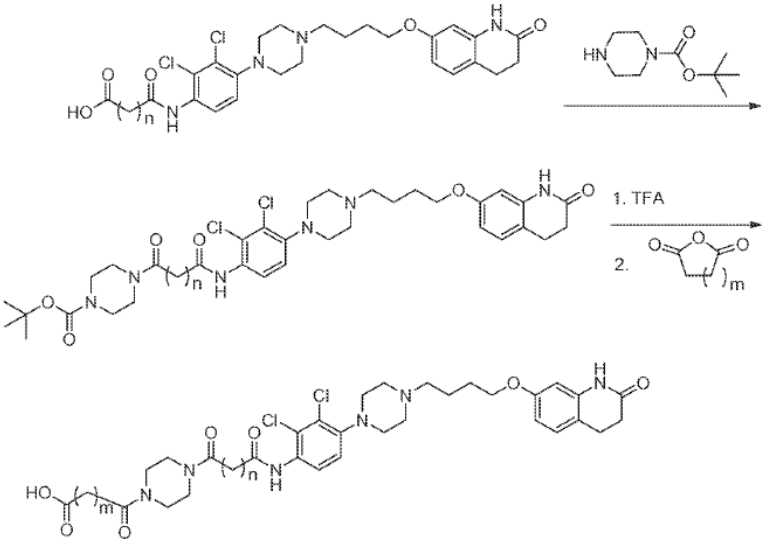
Esquema 4



Los separadores en haptenos pueden extenderse como se muestra en el Esquema 4. Los haptenos con separadores que tienen una funcionalidad de ácido carboxílico pueden disolverse en un disolvente adecuado, como diclorometano, bajo atmósfera inerte, y tratarse con N-t-butoxicarbonilpiperazina y una base apropiada, como diisopropiletilamina. La solución puede tratarse después con dietil cianofosfonato para instalar una fracción de piperazina en el separador. La desprotección de piperazina puede llevarse a cabo con ácido trifluoroacético u otros métodos conocidos en la técnica. La reacción con un anhídrido cíclico da compuestos de la Fórmula I donde R^1 es

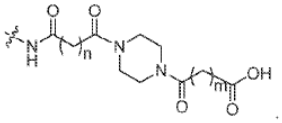


Esquema 5



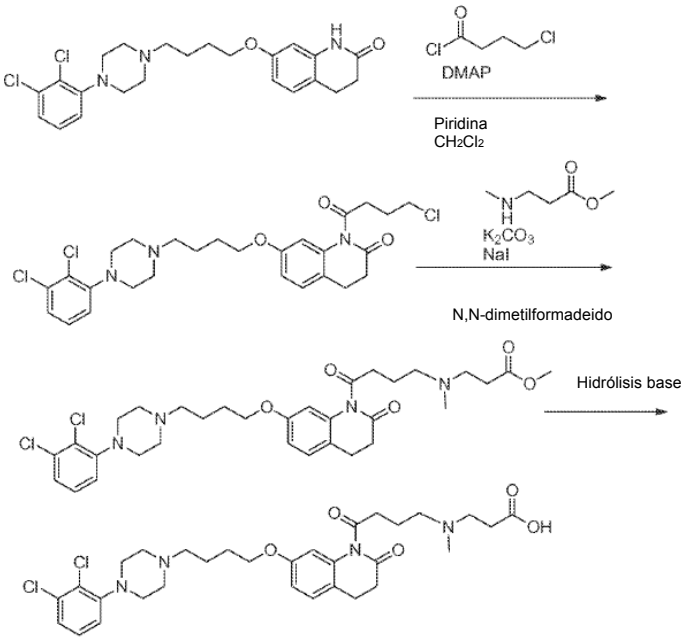
Los separadores en haptenos también pueden extenderse como se muestra en el Esquema 5. Los haptenos con separadores que tienen una funcionalidad de ácido carboxílico pueden disolverse en un disolvente adecuado, como diclorometano, bajo atmósfera inerte, y tratarse con N-t-butoxicarbonilpiperazina y una base apropiada, como diisopropiletilamina. La solución puede tratarse después con dietil cianofosfonato para instalar una fracción de

piperazina en el separador. La desprotección de piperazina puede llevarse a cabo con ácido trifluoroacético u otros métodos conocidos en la técnica. La reacción con un anhídrido cíclico da compuestos de la Fórmula I donde R^2 es



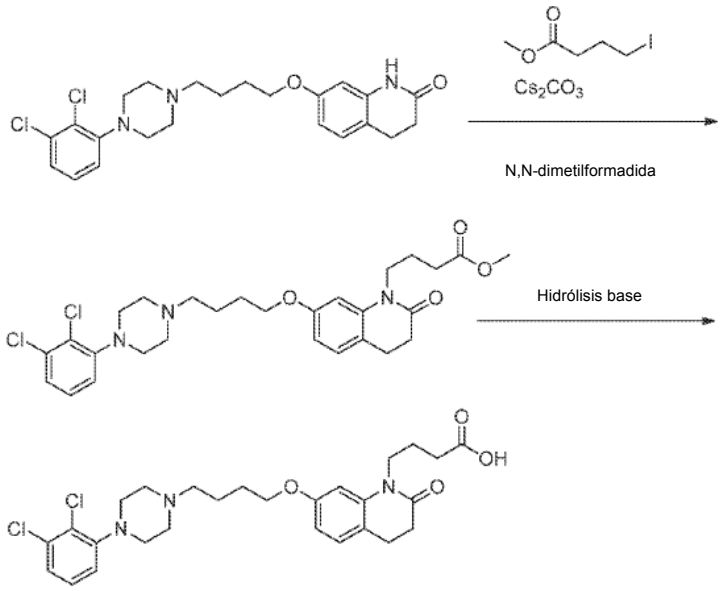
Los haptenos también pueden generarse directamente a partir de la molécula matriz mediante acilación o alquilación del nitrógeno de quinolinona. El esquema 6 representa una ruta sintética donde un grupo acilo puede añadirse a aripiprazol mediante reacción con el cloruro ácido de ácido 4-clorobutírico usando N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP) como un catalizador en presencia de una base tal como piridina en un disolvente aprótico, por ejemplo N,N-dimetilformadida, véase: Ejemplo 5, US20110230520. La sustitución nucleofílica del cloruro mediante éster N-metil-β-alanina puede realizarse en presencia de ioduro de sodio y una base, por ejemplo carbonato de potasio en un disolvente aprótico dipolar como N,N-dimetilformadida, véase: Penning, T. D., et al., J. Med Chem, 2002, 45:3482. La hidrólisis del grupo éster que usa métodos estándares conocidos por aquel experto en la técnica, como exposición a base acuosa, produce un hapteno que funciona con carboxi que puede además elaborarse usando métodos descritos previamente, un ejemplos de los cuales se representa en el Esquema 9 más abajo, para proporcionar un compuesto con funcionalidad adecuada para unirse a un transportador inmunogénico.

Esquema 6

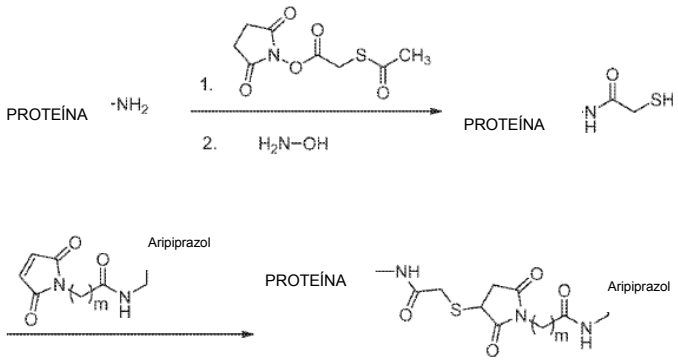


El esquema 7 ilustra un modo de unión de un grupo alquilo al nitrógeno del grupo de quinolinona de aripiprazol usando química de alquilación estándar. Un compuesto de yodo, por ejemplo metil-4-yodobutirato puede reaccionar con aripiprazol en presencia de una base como carbonato de cesio en un disolvente aprótico dipolar como N,N-dimetilformadida usando el método del Ejemplo 6 en US20120004165. La hidrólisis del grupo éster usando métodos estándares conocidos por aquel experto en la técnica, como exposición a base acuosa, produce un hapteno que funciona con carboxi que puede además elaborarse usando métodos descritos previamente, un ejemplos de los cuales se representa en el Esquema 9 más abajo, para proporcionar un compuesto con funcionalidad adecuada para unirse a un transportador inmunogénico.

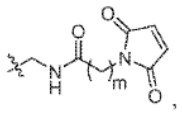
Esquema 7



Esquema 8



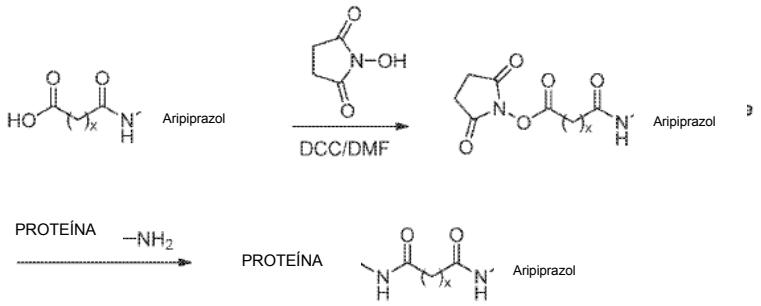
Los haptenos que funcionan con maleimida pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 8. La activación de residuos de proteína lisina mediante acilación de epsilon-nitrógeno con N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), seguido de la posterior hidrólisis del grupo S-acetil con hidroxilamina produce un grupo nucleofílico sulfihidrolo. La conjugación de la proteína activada con sulfihidrolo con el hapteno derivatizado de maleimida (preparado como se ha descrito en el esquema general 3) procede por medio de una reacción de adición Michael. Las proteínas adecuadas son conocidas por aquellos expertos en la técnica e incluyen hemocianina modificada de lapa, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina. Mientras el esquema 8 ilustra la conjugación proteína-hapteno donde R^1 es



,

puede usarse la misma química para conjugar cualquier hapteno que funciona con maleimida con una proteína.

Esquema 9



donde x es m o n, como se define en la Fórmula I.

Los haptenos que funcionan con ácido carboxílico pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 9. La reacción con N-hidroxisuccinimida y un agente de enlace adecuado, como diciclohexilcarbodiiimida (DCC) y una base como tributilamina, en un disolvente como DMF a una temperatura de aproximadamente 20ºC, durante aproximadamente 18 horas, activa el ácido carboxílico con el grupo que abandona de hidroxipirrolidina-2,5-diona. El separador activado y el hapteno pueden entonces conjugarse con una proteína en un disolvente, como tampón de fosfato pH 7,5, a aproximadamente 20 ºC durante aproximadametne 2,5 horas. Las proteínas adecuadas son conocidas por aquellos expertos en la técnica e incluyen hemocianina modificada de lapa, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina. Mientras el esquema 9 ilustra la conjugación proteína-hapteno donde R^2 es $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$, puede usarse la misma química para conjugar cualquier hapteno que funciona con CO_2H con una proteína.

Producción de anticuerpos

Los conjugados anteriores son útiles para la producción de anticuerpos que se unen a un fármaco antipsicótico con el que se generaron (aripiprazol). Estos anticuerpos pueden usarse en ensayo para detectar la presencia y/o cantidad de fármaco antipsicótico en muestras de pacientes. Tal detección permite el control terapéutico del fármaco que posibilita todos los beneficios del mismo. La detección de niveles de fármacos antipsicóticos puede ser útil para muchos fines, que incluyen: detección en combinación con la detección de otros fármacos antipsicóticos, incluyendo aquellos seleccionados del grupo consistente en risperidona, paliperidona, quetiapina, olanzapina y metabolitos de los mismos, permitiendo tal detección la medición simultanea de estos fármacos antipsicóticos; la determinación de adherencia o complimiento de un paciente a la terapia prescrita; uso como una herramienta de decisión para determinar si un paciente debería pasar de un régimen antipsicótico oral a un régimen antipsicótico inyectable de larga actuación; uso como una herramienta de decisión para determinar si el nivel de dosis o el intervalo de dosis de antipsicóticos orales o inyectables debería aumentar o disminuir para asegurar éxito o mantenimiento de eficacia o niveles seguros del fármaco; uso como un ayuda en la iniciación de terapia con fármacos antipsicóticos proporcionando evidencia del éxito de niveles mínimos de pK; uso para determinar bioequivalencia de fármaco antipsicótico en múltiples formulaciones o a partir de múltiples fuentes; uso para evaluar el impacto de polifarmacia e interacciones potenciales fármaco-fármaco; y uso como una indicación de que un paciente debería excluirse o incluirse en un ensayo clínico y como ayuda en el posterior control de cumplimiento con los requisitos relacionados con la medicación en el ensayo clínico.

Habiendo proporcionado los conjugados de la invención objeto, que comprende los compuestos y un transportador inmunogénico, pueden generarse anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados, que se unen con el fármaco antipsicótico. Tales anticuerpos que se contemplan particularmente incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales así como fragmentos de los mismos, por ejemplo, proteínas recombinantes que contienen el dominio de enlace con antígeno y/o uno o más regiones que determinan complementariedad de estos anticuerpos. Preferentemente, el anticuerpo se unirá con el fármaco y cualquier metabolito deseado farmacológicamente activo. Al alterar la localización de unió del transportador inmunogénico con los compuestos de la invención, puede diseñarse en los anticuerpos una selectividad y reactividad cruzada con metabolitos. Para aripiprazol, la reactividad cruzada con dehidroaripiprazol puede ser deseable. Pueden generarse anticuerpos que detecten tanto aripiprazol como dehidroaripiprazol, o pueden generarse anticuerpos que detecten cada uno por separado (definiendo así las propiedades “de enlace específicas” del anticuerpo). Un anticuerpo se enlaza específicamente con uno o más compuestos cuando su enlace de uno o más compuestos es equimolar o sustancialmente equimolar.

Los métodos para producir tales anticuerpos comprenden inocular un huésped con el conjugado (el compuesto y el transportador inmunogénico siendo un inmunógeno) representando características de la presente invención. Los huéspedes adecuados incluyen, aunque no se limitan a, ratones, ratas, hámsteres, cerdos de guinea, conejos, pollos, burros, caballos, monos, chimpancés, orangutanes, gorilas, humanos y cualquier especie capaz de

montar una respuesta inmune madura. Los procedimientos de inmunización están bien establecidos en la técnica y se exponen en numerosos tratados y publicaciones que incluyen “The Immunoassays Hanbook”, 2ª edición, editados por David Wild (Nature Publishing Group, 200) y las referencias aquí citadas.

Preferentemente, un inmunógeno que representa características de la presente invención se administra a un sujeto huésped, por ejemplo, un animal o humano, en combinación con un adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque no se limitan a, adyuvante de Freud, hidróxido de aluminio en polvo (alum), hidróxido de aluminio junto con *Bordetella pertussi*, y monofosforilo lípido A-sintético trehalosa dicorinomicolato (MPL-TDM).

Los anticuerpos monoclonales pueden cultivarse en un huésped mamífero mediante una o más inyecciones de un inmunógeno que pueden administrarse opcionalmente junto con un adyuvante. Típicamente, un inmunógeno o una combinación de un inmunógeno y un adyuvante se inyecta en un huésped mamífero mediante una o múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Preferentemente, el programa de inmunización se realiza durante al menos una semana, y más preferentemente, durante dos o más semanas. Los anticuerpos policlonales producidos de esta manera pueden aislarse y purificarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante los métodos de hibridoma bien establecidos de Kohle y Milstein, por ejemplo, Nature 256:495-497 (1975). Los métodos de hibridoma típicamente incluyen inmunizar un huésped o linfocitos de un huésped, cosechar el anticuerpo monoclonal que secreta o que tiene el potencial para secretar linfocitos, fusionar los linfocitos con célula inmortalizadas y seleccionar células que secretan el anticuerpo monoclonal deseado.

Un huésped puede inmunizarse para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos específicos para un inmunógeno. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Si se desean células humanas, pueden usarse linfocitos de sangre periférica, aunque las células del bazo o linfocitos de otras fuentes de mamífero son preferentes.

Los linfocitos pueden fusionarse con una línea celular inmortalizada para formar células de hibridoma, un proceso que puede facilitarse mediante el uso de un agente de fusión, por ejemplo, glicol de polietileno. A modo de ilustración, pueden usarse células de mieloma de un roedor mutante, bovinas o humanas inmortalizadas mediante transformación. Las poblaciones sustancialmente puras de células de hibridoma, en oposición a células inmortalizadas no fusionadas, son preferentes. Así, después de la fusión, las células pueden crecer en un medio adecuado que inhibe el crecimiento o supervivencia de células inmortalizadas no fusionadas, por ejemplo, usando células de mieloma mutante que carecen de enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). En tal caso, hipoxantina, aminopterina y timidina pueden añadirse al medio (medio HAT) para prevenir el crecimiento de células deficientes de HGPRT mientras se permite que los hibridomas crezcan.

Preferentemente, las células inmortalizadas fusionadas de manera eficiente, pueden aislarse de poblaciones mezcladas mediante selección de un medio tal como HAT, y mantener una expresión estable y de alto nivel de anticuerpo después de la fusión. Las líneas celulares inmortalizadas preferentes incluyen líneas celulares de mieloma disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA.

Debido a que las células de hibridoma típicamente secretan anticuerpo extracelularmente, el medio de cultivo puede ensayarse para la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para el fármaco antipsicótico. La inmunoprecipitación de ensayos de enlace in vitro, por ejemplo, radioinmunoensayos (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) puede usarse para medir la especificidad de enlace de anticuerpos monoclonales.

Las células de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales pueden aislarse como clones sencillos limitando los procedimientos de dilución y sub-cultivados. Los medios de cultivo adecuados incluyen, aunque no se limitan a, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco, RPMI-1640 y medio libre de polipéptidos, reducido de polipéptidos o libre de suero, por ejemplo, Ultra DOMA PF o HL-1, disponible en Biowhittaker, Walkersville, MD. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como ascitis.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y/o purificarse de un medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina (Ig) incluyendo, aunque no se limitan a, polipéptido A-SEPHAROSE, cromatografía con hidroxiapatita, electroforesis de gel, diálisis, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía por afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos recombinantes como los descritos en la patente de Estados Unidos Nº 4.166.452. Los anticuerpos monoclonales que codifican ADN también pueden aislarse y secuenciarse usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que específicamente se unen con genes de cadena de anticuerpo murino pesadas o ligarse, preferentemente para sondar ADN aislado de líneas celulares de hibridoma de anticuerpo monoclonal que secreta anticuerpos específicos para fármacos antipsicóticos.

Inmunoensayos

Los anticuerpos así producidos pueden usarse en inmunoensayos para reconocer/unirse con el fármaco antipsicótico, detectando de este modo la presencia y/o cantidad del fármaco en una muestra de un paciente. Preferentemente, el formato del ensayo es un formato de inmunoensayo competitivo. Tal formato de ensayo y otros ensayos se describen, entre otros sitios, en Hampton et al. (Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul, MN 1990) y Maddox et al. (J. Exp. Med. 158:12111, 1983).

También puede proporcionarse un kit de reactivos que comprenda un anticuerpo como el descrito anteriormente. Un kit de reactivos representativo puede comprender un anticuerpo que se enlaza con el fármaco antipsicótico, aripiprazol, un complejo que comprende un análogo de fármaco antipsicótico o un derivativo del mismo acoplado a una fracción etiquetadora, y también puede comprender opcionalmente uno o más calibradores que comprenden una cantidad conocida de un fármaco antipsicótico o un estándar relacionado.

Como se ha señalado anteriormente, los kits de reactivos pueden comprender calibradores y/o materiales de control que comprende una cantidad conocida del analito que se medirá. La concentración del analito puede calcularse comparando los resultados obtenidos para una muestra con los resultados obtenidos para un estándar. Una curva de calibración puede construirse y usarse para relacionar los conjuntos de resultados y para determinar la concentración de un analito en una muestra.

Cualquier muestra que sea sospechosa de contener un analito, por ejemplo, un fármaco antipsicótico, puede analizarse de acuerdo con los métodos de las realizaciones preferentes en el presente. La muestra puede pre-tratarse si se desea y puede prepararse en cualquier medico conveniente que no interfiera con el ensayo. Preferentemente, la muestra comprende un medio acuoso como un fluido corporal de un huésped, más preferentemente plasma o suero.

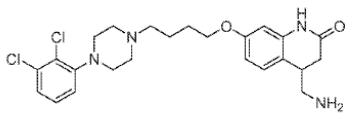
Las solicitudes co-pendientes tituladas “Haptenos de Aripiprazol” (Nº de Expediente: PRD3265USPSP, inventor con primer nombre: Remmerie), “Haptenos de Olanzapina” (Nº de Expediente: PRD3266USPSP, inventor con primer nombre: Remmerie), “Haptenos de Paliperidona” (Nº de Expediente: PRD3267USPSP, inventor con primer nombre: Remmerie), “Haptenos de Quetiapina” (Nº de Expediente: PRD3268USPSP, inventor con primer nombre: Remmerie), “Haptenos de Risperidona y Paliperiona” (Nº de Expediente: PRD3269USPSP, inventor con primer nombre: Remmerie), “Anticuerpso para Haptenos de Aripiprazol y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5128USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Haptenos de Olanzapina y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5132USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Haptenos de Paliperidona y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5126USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Haptenos de Quetiapina y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5134USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Haptenos de Risperidona y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5130USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Aripiprazol y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5129USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Olanzapina y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5133USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Paliperidona y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5127USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Quetiapina y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5135USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko), “Anticuerpos para Risperidona y Uso de los mismos” Nº de Expediente: CDS5131USPSP, inventor con primer nombre: Hryhorenko).

Ejemplos

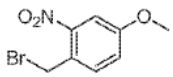
Los compuestos representativos de la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos sintéticos generales descritos más abajo. Los compuestos de la Fórmula (I) pueden prepararse mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los siguientes ejemplos solamente pretenden representar ejemplos de la invención y no pretenden de ninguna manera limitar la invención.

Ejemplo 1

4-(aminometil)-7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-uno

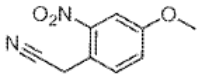


Etapa A
1-(bromometil)-4-metoxi-2-nitrobenceno



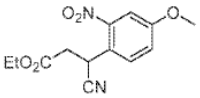
A una solución bien mezclada de compuesto 4-metoxi-1-metil-2-nitrobenceno (218 g, 1,30 mol) en CCl_4 (1500 mL) se añadió AIBN (21,7 g, 0,13 mol) y NBS (348 g, 1,96 mol). Después de calentar la mezcla de la reacción a durante 16 horas bajo N_2, se añadió agua y el producto se extrajo de la fase acuosa con CH_2Cl_2. La fase orgánica resultante se lavó con salmuera, secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se evaporó para dar un sólido que se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo, 20:1) para el compuesto del título como un sólido amarillo: ESI-MS (M+1) 246. ^{1}H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz); δ (ppm) 7,55 (s, 1H), 7,46-7,42 (d, 1H), 7,14-7,11 (d, 1H), 4,79 (s, 2H), 3,90 (s, 3H).

Etapa B
2-(4-metoxi-2-nitrofenil)acetonitrilo



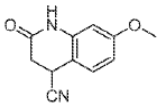
A una solución mezclada de 1-(bromometil)-4-metoxi-2-nitrobenceno, preparada como se ha descrito en la Etapa A (40 g, 0,163 mol) en THF (500 mL) y EtOH (100 mL) se añadió una solución de KCN (26,6 g, 0,408 mol) en agua (100 mL). La mezcla de la reacción se mezcló a 0ºC durante 1 hora y después durante 3 horas más a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se diluyó con agua (500 mL) y la fase acuosa se extrajo con DCM (500 mL) y después se lavó con salmuera, secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice para dar el compuesto del título: ESI-MS (M+1) 193. ^{1}H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz); δ (ppm) 7,72 (s, 1H), 7,63-7,61 (d, 1H), 7,26-7,61 (d, 1H), 4,14 (s, 2H), 3,93 (s, 3H).

Etapa C
Etil 3-ciano-3-(4-metoxi-2-nitrofenil)propanoato



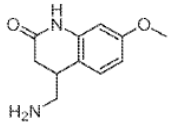
A una solución de 2-(4-metoxi-2-nitrofenil)acetonitrilo, preparada como se ha descrito en la Etapa B (5,5 g, 0,0286 mol) en DMF (100 mL) se añadió $BrCH_2CO_2Et$ (5,71 g, 0,034 mol) y K_2CO_3 (11,86 g, 0,086 mol) a 0 ºC. La mezcla de la reacción se mezcló a 0ºC durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 2 horas más. Después de completar la reacción mediante monitorización con TLC, se añadió agua. La reacción se extrajo con acetato de etilo; la fase orgánica se lavó con salmuera, secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice para dar el compuesto del título: ESI-MS (M+1) 279. ^{1}H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz); δ (ppm), 7,70-7,68 (d, 1H), 7,57-7,56 (s, 1H), 7,24-7,21 (d, 1H), 5,13-4,98 (m, 1H), 4,20-4,18 (m, 2H), 3,89 (s, 3H), 2,99-2,97 (d, 2H), 1,28-1,24 (t, 3H).

Etapa D
7-metoxi-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-carbonitrilo



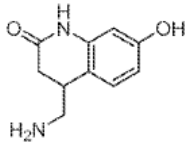
A una solución de etil 3-ciano-3-(4-metoxi-2-nitrofenil)propanoato, preparadas como se ha descrito en la Etapa C (9,0 g, 0,032 mol) en MeOH (100 mL), se añadió Sn (19,3 g, 0,162 mol), seguido de ácido hidroclórico/MeOH (40 ml, 1:1) todo a la vez. La reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se retiró *in vacuo*. Después se añadió acetato de etilo, y se añadió una solución acuosa de $NaHCO_3$ para neutralizar la solución. La fase orgánica se concentró hasta conseguir el producto crudo que se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

Etapa E
4-(aminometil)-7-metoxi-3,4-dihidroquinolina-2(1H)-uno



7-metoxi-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-carbonitrilo crudo, preparado como se ha descrito en la Etapa D (6 g, 0,03 mol) y Raney Ni (10 g) se suspendieron en una mezcla de MeOH (100 mL) y 3 mL de trietilamina. La mezcla de la reacción se mezcló bajo atmósfera de H_2 (50 Psi) a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de completar la reacción mediante monitorización con TLC, el catalizador se filtró, y después el disolvente se retiró *in vacuo* para dar el producto crudo que se usó para la siguiente etapa sin más purificación.

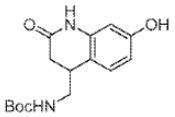
Etapa F
4-(aminometil)-7-hidroxi-3,4-dihidroquinoina-2(1H)-uno



A una solución de 4-(aminometil)-7-metoxi-3,4-dihidroquinolina-2(1H)-uno crudo, preparadas como se ha descrito en la Etapa E (8,8 g, 0,0427 mol) en diclorometano (100 mL), se añadió BBr3 (85 g, 0,342 mol) en diclorometano (1M) en forma de gotas a -14ºC, y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante la noche. Después de completar la reacción mediante monitorización con TLC, se añadió metanol lentamente a 0ºC para templar la reacción, y el disolvente se evaporó *in vacuo* para conseguir el producto crudo que se usó directamente en la siguiente etapa.

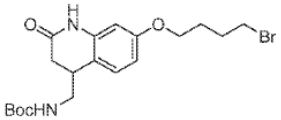
Etapa G

Tert-butil ((7-hidroxi-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-il)metil)carbamato



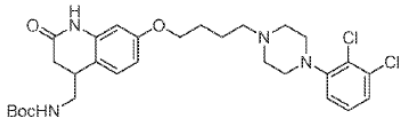
4-(aminometil)-7-hidroxi-3,4-dihidroquinoina-2(1H)-uno crudo, preparado como se ha descrito en la Etapa F (8,2 g, 0,0427 mol) y (Boc)2º (4,65 g, 0,021 mol), trietilamina (10 mL) se añadieron a 100 mL de etanol. La reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de parar la reacción, el disolvente se evaporó *in vacuo*, y se añadió acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, solución acuosa $NaHCO_3$, secó sobre Na_2SO_4 y se concentró *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante cromatografía para dar el compuesto del título: ESI-MS (M+1) 292. ^{1}H NMR: (DMSO-d_6, 400 MHz); δ (ppm), 9,96 (s, 1H), 9,31 (s, 1H), 6,95-6,89 (m, 2H), 6,33 (d, 2H), 3,00-2,97 (m, 2H), 2,90-2,96 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 2,30-2,34 (m, 1H), 1,37 (s, 9H).

Etapa H
Tert-butil ((7-(4-bromobutoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-il)metil)carbamato



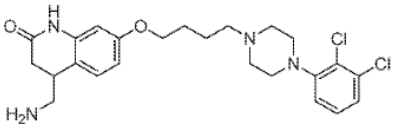
A una solución de tert-butil ((7-hidroxi-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-il)metil)carbamato, preparada como se ha descrito en la Etapa H, (1,0 mmol, 292 mg) y 1,4-dibromobutano (1,1 mmol, 237,5 mg) en DMF (1,5 mL) se añadió K_2CO_3 anhidro (1,2 mmol, 166 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche hasta que HPLC y LC/MS indicaron que la reacción estaba completa para dar el compuesto del título, que se sometió a la siguiente reacción sin purificación. MS *m/z* 428 (MH^+).

Etapa I
Tert-butil ((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-il)metil)carbamato



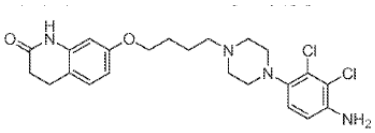
A una solución de tert-butil ((7-(4-bromobutoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-il)metil)carbamato, preparada como se ha descrito en la Etapa H, en DMS se añadió 1-(2,3-dicloro-fenil)-piperazina hidrocloruro (1,0 mmol, 268 mg) y K_2CO_3 (1,23 mmol, 170 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó in vacuo y el residuo se partió dividió entre diclorometano y solución acuosa saturada $NaHCO_3$. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano adicional. Las capas orgánicas se combinaron y concentraron. El residuo se sometió después a cromatografía de columna en gel de sílice con gradiente 0,10% metanol en diclorometano para dar el compuesto del título como un sólido. MS *m/z* 578 (MH^+).

Etapa J
4-(aminometil)-7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-3,4-dihidroquinolina-2(1H)-uno

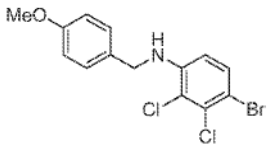


A una solución de tert-butil ((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-il)metil)carbamato, preparada como se ha descrito en la Etapa I (200 mg, 0,35 mmol) en diclorometano (5 mL) se añadió 1 mL de TFA. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. El disolvente se evaporó in vacuo y el residuo se dividió entre diclorometano y solución saturada $NaHCO_3$. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano adicional. Las capas orgánicas se combinaron, secaron sobre Na_2SO_4 y concentraron. El residuo se sometió después a cromatografía de columna en gel de sílice con 10% metanol en diclorometano, seguido de 10% 7N metanol de amoniaco en diclorometano, para dar el compuesto del título como un sólido. Este producto se purificó después mediante recristalización a partir de diclorometano y heptanos para dar el producto final como un sólido blanco. MS *m/z* 477 (MH^+). ESI-MS (M+1) 279. ^1H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz); δ (ppm), 7,40 (s, 1H), 7,25-7,05 (m, 3H), 7,00 (d, 1H), 6,60 (d, 1H), 6,30 (s, 1H), 4,00 (m, 2H), 3,10 (m, 4H), 3,00-2,60 (m, 9H), 2,50 (m, 2H), 1,90-1,40 (m, 6H). Calculado para $C_{24}H_{30}Cl_2N_4O_2$, C, 60,38; H, 6,33; N, 11,75. Encontrado C, 60,32; H, 5,89, N, 11,26.

Ejemplo 2
7-(4-4-(4-amino-2,3-diclorofenil(piperazin-1-il)butoxi)-3,4-dihidroquinolina-2(1H)-uno



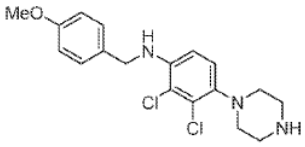
Etapa A
4-bromo-2,3-dicloro-N-(4-metoxibenzil)anilina



A una solución de 4-bromo-2,3-dicloro-fenilamina (3,215 g, 13,3 mmol) y 1-clorometil-4-metoxi-benceno (2,297 g, 14,7 mmol) en 23 mL de DMF se añadió yoduro de potasio (2,214 g, 13,3 mmol) y 647 mg de hidruro de sodio (60% dispersión de aceite). Después de mezclar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla de la reacción se evaporó *in vacuo* y el residuo se dividió entre diclorometano y solución saturada $NaHCO_3$. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano adicional. Las capas orgánicas se combinaron,

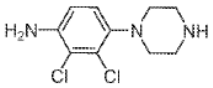
secaron sobre Na_2SO_4 y concentraron. El residuo se sometió después a cromatografía de columna en gel de sílice con 30% acetato de etilo en heptanos para dar el compuesto del título como un sólido amarillo; MS *m/z* 362 (MH^+).

Etapa B
2,3-dicloro-N-(4-metoxibencil)-4-(piperazin-1-il)anilina



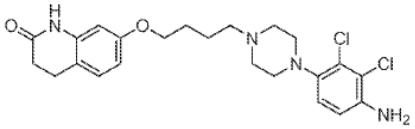
Una mezcla de 4-bromo-2,3-dicloro-N-(4-metoxibenzil)anilina, preparada como se ha descrito en la etapa previa, (3,61 g, 10 mmol), piperazina (1,034 g, 12 mmol), sodio/butóxido (1,16 g, 12 mmol) y tris(dibencillideneacetona) dipaladio(0) (180 g, 2% mol) en 16 mL de tolueno en un matraz sellado de paredes anchas se mezcló y calentó en un baño de aceite a 100ºC durante 2,5 días. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se dividió entre diclorometano y agua. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano adicional. Las capas orgánicas se combinaron, secaron sobre Na_2SO_4, filtraron y concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice con 10% metanol en diclorometano, seguido de 10% 7N metanol de amoniaco en diclorometano, para dar el compuesto del título como un sólido marrón claro. MS *m/z* 367 (MH^+).^{1}H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz); δ (ppm), 7,28 (d, 2H), 6,98 (d, 2H), 6,50 (d, 1H), 4,60 (s, 1H), 4,30 (m, 2H), 3,80 (m, 3H), 3,10-2,85 (m, 8H), 2,30 (s, 1H).

Etapa C
2,3-dicloro-4-(piperazin-1-il)anilina



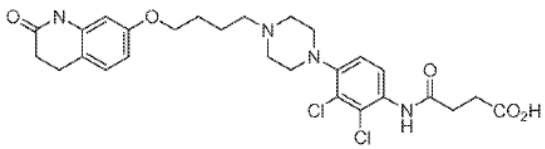
A una solución de 2,3-dicloro-N-(4-metoxibencil)-4-(piperazin-1-il)anilina, preparada como se ha descrito en la etapa previa (562 mg, 1,54 mmol) en diclorometano (5 mL) se añadieron 5 mL de TFA. La mezcla de la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 5 horas, y después se evaporó *in vacuo* hasta secarse. El residuo se volvió a disolver en diclorometano y evaporó hasta secarse. El compuesto del título se usó en la siguiente reacción sin evaporación. MS *m/z* 245(MH^+).

Etapa D
7-(4-(4-(4-amino,2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-3,4-dihidroquiniolina-2(1H)-uno



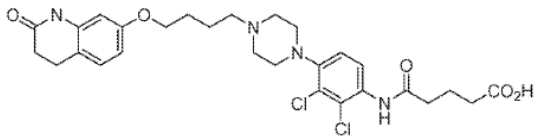
A una solución de 2,3-dicloro-4-(piperazin-1-il)anilina, preparada como se ha descrito en la etapa previa (1,535 mmol) como sal TFA en DMF (6 mL) se añadió a una solución de 7-(4-bromo-butoxi)-3,4-dihidro-1H-quinolina-2-uno (1,535 mmol) disponible en mercado en DMF (1 mL), K_2CO_3 (2,121 g) y 1 mL de DMF. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido se filtró y agitó con diclorometano. La solución se evaporó *in vacuo* y el residuo se sometió después a cromatografía de columna en gel de sílice con un gradiente 0-10% metanol en diclorometano, seguido de 10% 7N metanol de amoniaco en diclorometano, para dar el compuesto del título como un sólido. MS *m/z* 463 (MH^+).^{1}H NMR: (DMSO-d_6, 400 MHz); δ (ppm), 10,0 (s, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 6,75 (d, 1H), 6,50 (d, 1H), 6,45 (s, 1H), 5,3 (s, 2H), 3,90 (m, 2H), 2,90-2,70 (m, 6H), 2,50-2,30 (m, 8H); 1,80-1,50 (m, 4H). Calculado para $C_{23}H_{28}Cl_2N_4O_2$, es C, 59,61; H, 6,09; N, 12,09. Encontrado C, 59,44; H, 5,87, N, 11,77.

Ejemplo 3
4-((2,3-dicloro-4(4-(4-((2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-7-il)oxi)butil)piperazin-1-il)fenil)amino-4-ácido oxobutanoico



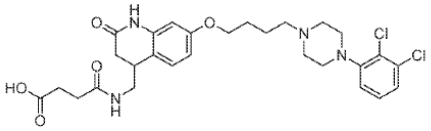
Una solución del Ejemplo 2 (115,5 mg, 0,25 mmol) y anhídrido succínico (50 mg, 0,5 mmol) en piridina (1,5 mL) se mezcló y calentó a 110ºC en un horno microondas durante 5,5 horas. La solución se evaporó *in vacuo* hasta secarse. El residuo se volvió a disolver en diclorometano y se evaporó hasta secarse; y después se volvió a disolver en metanol y se evaporó hasta secarse. El producto crudo se purificó en una columna Agela hilic con gradiente 0-20% metanol en diclorometano para dar un sólido, que además se purificó mediante recristalización a partir de metanol y secó a 40-50ºC en un horno de vació para dar el compuesto del título. MS *m/z* 563 (MH^+).^{1}H NMR: (DMSO-d_6, 400 MHz); δ (ppm), 12,1 (s, 1H), 10,0 (s, 1H), 9,60 (s, 1H), 7,5 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,50 (d, 1H), 6,45 (s, 1H), 3,90 (m, 2H), 3,00 (m, 4H), 2,30 (m, 2H), 2,20-2,30 (m, 12H), 1,80-1,55 (m, 4H). Calculado para $C_{27}H_{33}Cl_2N_4O_2$, es C, 57,55; H,5,72; N, 9,95. Encontrado C, 55,92; H, 5,85, N, 9,58.

Ejemplo 4
5-((2,3-dicloro-4(4-(4-((2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-7-il)oxi)butil)piperazin-1-il)fenil)amino-5-ácido oxopentanoico



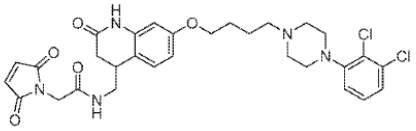
Una solución del Ejemplo 2 (83 mg, 0,18 mmol) y anhídrido glutárico (41 mg, 0,36 mmol) en piridina (1,0 mL) se mezcló y calentó a 110ºC en un horno microondas durante 4,5 horas. La solución se evaporó *in vacuo* hasta secarse. El residuo se purificó en una columna Agela hilic (12 g) con gradiente 0-30% metanol y secó a 40-50ºC en un horno de vació para dar el compuesto del título. MS *m/z* 578 (MH^+).

Ejemplo 5
4-(((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-4-il)metil)butil)amino)-4-ácido oxopentanoico



Una solución del Ejemplo 1 (24,1 mg, 0,05 mmol) y anhídrido glutárico (10 mg, 0,10 mmol) en THF (1,0 mL) se mezcló a temperatura ambiente durante la noche. La solución se evaporó *in vacuo* hasta secarse. El residuo se purificó en una columna de gel de sílice (12 g) con gradiente 0-30% metanol en diclorometano y secó a 40-50ºC en un horno de vació para dar el compuesto del título. MS *m/z* 578 (MH^+).

Ejemplo 6
N-((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)metil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)acetamida



A una solución del Ejemplo 1 (PM 477,4, 2,2 mg, 4,61 µmoles) en 110 µL de DMF y 2,3 µL de tributilamina se añadieron 116 µL de una solución DMF de N-(α-maleimidoacetoxi)succinimida éster (AMAS, PM 252,2, 10 mg/mL, 1,16 mg, 4,61 µmoles). La solución resultante se dejó mezclar durante 90 minutos a 20ºC y después se usó así en una reacción de conjugación con proteína activada de tiol.

Ejemplo 7
Conjugado N-((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)metil)2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida- hemocianina modificada de lapa.

A 3,23 mL de una solución de hemocianina modificada de lapa (KLH PM 100.000 14,6 mg, 0,146 µmoles) en 100mM de tampón de fosfato, 0,46M cloruro de sodio, pH 7,4 se añadieron 33,7 µL de una solución DMF de N-Succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA PM 231,2, 25 mg/mL, 0,84 mg, 3,65 µmoles). La solución resultante de incubó a 20 ºC durante 1 hora en un mezclador rodillo. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100 mM de tampón de fosfato, 0,46M cloruro de sodio y 5 mM EDTA, en pH 6,0. A 6,46 mL de la solución KLH-SATA (13,7 mg, 0,137 µmoles) se añadieron 646 µL de 2,5M hidroxilamina y 50 mM EDTA en pH 7,0. La solución

resultante se incubó a 20ºC durante 1 hora en un mezclador rodillo. La reacción se trató con 169 µL de solución N-((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)metil)2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida (preparada como se ha descrito en el ejemplo 6) (3,46 µmoles) La mezcla nubosa resultante se incubó durante 2 horas a 20ºC en un mezclador rodillo. La reacción se filtró a través de un filtro jeringa de 0,2 µm y después se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100mM tampón de fosfato y 0,46M cloruro de sodio a pH 7,4, para dar el conjugado KLH del Ejemplo 6.

Ejemplo 8
Conjugado N-((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)metil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida-tiroglobulina bovina

A 2,14 mL de una solución de tiroglobulina bovina (BTG, PM 660.0000, 21,8 mg, 0,033 µmoles) en un tampón de fosfato de 100 mM a pH 7,5 se añadieron 61,1 µL de una solución DMF de N-succinimidil-S-aetiltioacetato (SATA, PM 231,2, 25 mg/mL; 1,53 mg, 6,6 µmoles). La solución resultante se incubó a 20ºC durante 1 hora en un mezclador rodillo. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100mM tampón de fosfato, 5mM EDTA, a pH 6,0. A 5,79 mL de BTG-SATA (20,5 mg, 0,031 µmoles) se añadieron 579 µL de 2,5 M hidroxilamina y 50 mM EDTA en pH 7,0. La solución resultante se incubó a 201C durante 1 hora en un mezclador rodillo. La reacción se trató con 304,0 µL de solución N-((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)metil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida (preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 6) (6,2 µmoles). La mezcla nubosa resultante se incubó durante 2 horas a 20ºC en un mezclador rodillo. La reacción se filtró a través de un filtro jeringa de 0,45 µm y después se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100 mM tampón de fosfato y 0,14M cloruro de sodio en pH 7,4, para dar el conjugado de tiroglobulina bovina del Ejemplo 6.

Ejemplo 9
Conjugado N-((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)metil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida-ovoalbúmina

Etapa A
A 1,0 mL de una solución de ovoalbúlmina (PM 44.300, 10,0 mg, 0,23 µmoles) en 100 mM tampón de fosfato en pH 7,5 se añadieron 31,3 µL de una solución DMF de N-succinimidil-S-aetiltioacetato (SATA, PM 231,2, 25 mg/mL; 0,78 mg, 3,4 µmoles). La solución resultante se incubó a 20ºC durante 1 hora en un mezclador rodillo. La reacción se trató con 100 µL de 2,5M hidroxilamina y 50 mM EDTA en pH 7,0. La solución resultante se incubó a 20ºC durante 15 minutos en un mezclador rodillo. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100mM de tampón de fosfato y 5 mM EDTA a pH 6,0.

Etapa B
A la ovoalbúmina-SH (3,1 mL, 8,3 mg, 0,187 µmol) preparada como se ha descrito en la Etapa A, se añadió solución N-((7-(4-(4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il)butoxi)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)metil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida (preparada como se ha descrito en el ejemplo 6) (185,7 µL, 3,75 µmoles). La mezcla nubosa resultante se incubó durante 2,5 horas a 20ºC en un mezclador rodillo. La reacción se filtró a través de un filtro jeringa de 0,45 µm y después se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100 mM de tampón de fosfato, 0,14M cloruro de sodio en pH 7,4, para dar el conjugado de ovoalbúmina del Ejemplo 6.

Ejemplo 10
Inmunoensayo competitivo para Aripiprazol

Después de una serie de inmunizaciones con los inmunógenos descritos en los Ejemplos 7-9, los sangrados de la cola del ratón se sometieron a pruebas para reactividad usando un ELISA. Los sobrenadantes de hibridoma también se sometieron a pruebas, y los datos del ELISA mostrados en la Tabla 8 más abajo muestran la reactividad de varios hibridomas (la pareja de fusión fue células NSO).

Tabla 8

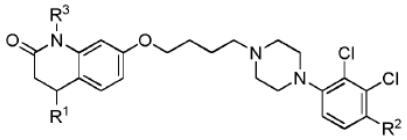
	Placa 1				
Dilución	1	2	3	4	5
400	3C1	3D7	5C6	5C7	5H11
400					
1200					
1200					
3600					
3600					
10800					
10800					
400	0,8165	0,7299	0,196	3,2953	0,0373
400	0,7057	0,5671	0,1525	2,9591	0,0371
1200	0,2413	0,2186	0,0701	1,9242	0,0348
1200	0,2474	0,2278	0,0653	1,7829	0,0336
3600	0,102	0,0963	0,0472	0,739	0,0288
3600	0,099	0,0954	0,051	0,7225	0,0281
10800	0,0534	0,0526	0,0381	0,2878	0,0215
10800	0,0644	0,0588	0,0411	0,2799	0,0326

Después el sobrenadante se probó mediante ELISA de competición para determinar si la señal fue específica para aripiprazol o dehidroaripiprazol. Las Figs. 1 y 2 muestran los resultados de dos hibridomas representativos, 3C1 y 3D7. Los datos muestran reactividad para aripiprazol y dehidroaripiprazol.

La Fig. 3 muestra el formato de inmunoensayo competitivo usado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral donde el anticuerpo de captura, clon aripiprazol 5C7, se depositó en un chip junto con un conjugado de detección consistente en aripiprazol conjugado con un fluoróforo. En este formato competitivo como el mostrado en la Fig. 3, un nivel bajo de analito (aripiprazol) da como resultado una señal alta, mientras que un alto nivel de analito (aripiprazol) da como resultado una señal baja. En referencia a las Figs. 4 y 5 que muestran los resultados del ensayo como funcionan en un dispositivo de flujo lateral, cuando la dosis de aripiprazol en la muestra aumentó, se compite para sitios de enlace en los anticuerpos. La cantidad de aripiprazol en la muestra puede por lo tanto calcularse a partir de la pérdida de fluorescencia en comparación con una muestra sin fármaco presente.

REIVINDICACIONES

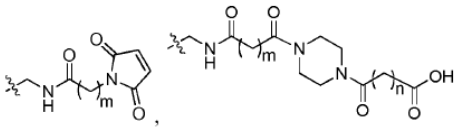
1. Un compuesto de la Fórmula I:



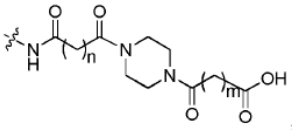
Fórmula I

donde:

R^1 es H



$CH_2NH_2CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H,



NH_2, $NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 y R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

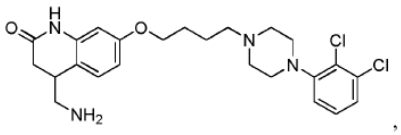
2. El compuesto de la Reivindicación 1 donde:

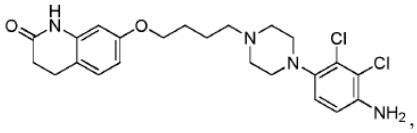
R^1 es H, CH_2NH_2, o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
m es 1, 2 o 3;
n es 1, 2 o 3.

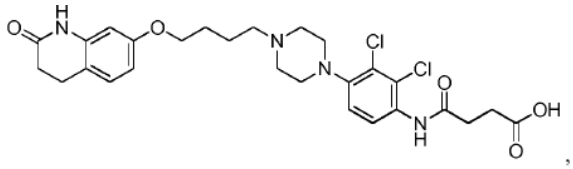
3. El compuesto de la Reivindicación 1 donde:

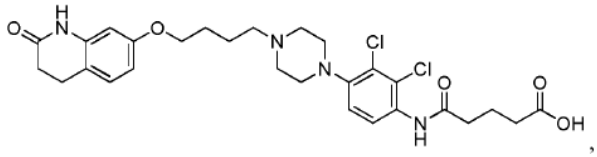
R^1 es H, CH_2NH_2, o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
R^2 es H, NH_2 o $NHC(O)(CH_2)_nCO_2H$; siempre y cuando cualquiera de R^1 o R^2 sea H, y además siempre y cuando R^1 o R^2 no sean ambos H simultáneamente;
R^3 es H;
m es 2;
n es 2.

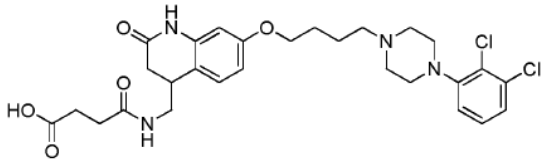
4. Los compuestos de la Reivindicación 1, seleccionados del grupo consistente en:



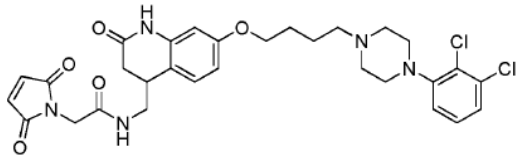




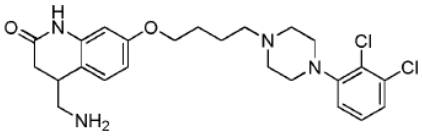




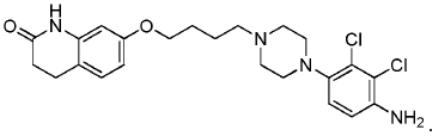
,y



5. El compuesto de la Reivindicación 4 que es



6. El compuesto de la Reivindicación 4 que es

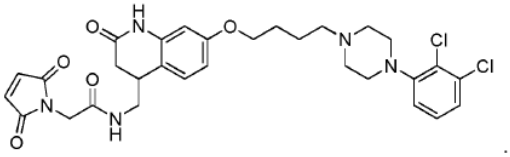


7. Un conjugado del compuesto de la Reivindicación 1 y un transportador inmunogénico.

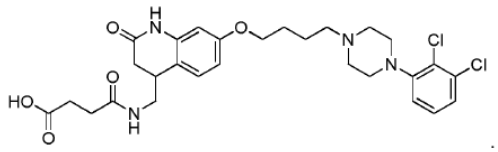
8. El conjugado de la Reivindicación 7 donde el transportador inmunogénico es una proteína.

9. El conjugado de la Reivindicación 8 donde la proteína es una hemocianina modificada de lapa, tiroglobulina bovina u ovoalbúmina.

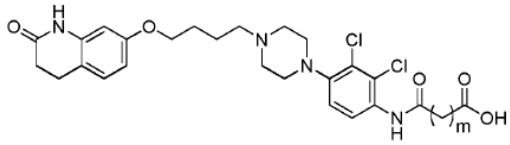
10. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 donde el compuesto es:



11. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 donde el compuesto es:



12. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 donde el compuesto es:



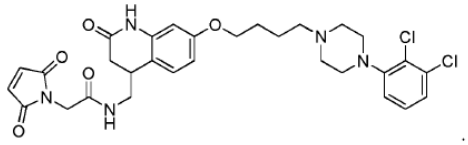
donde m es 2 o 3.

13. El conjugado de la Reivindicación 7 hecho mediante el proceso de poner en contacto un compuesto de la Reivindicación 1 con un transportador inmunogénico.

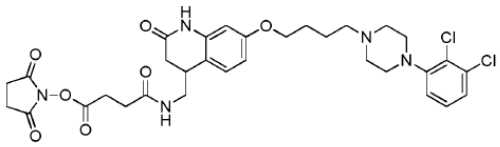
14. El conjugado de la Reivindicación 13 donde el transportador inmunogénico es una proteína.

15. El conjugado de la Reivindicación 14 donde la proteína es una hemocianina modificada de lapa, tiroglobulina bovina u ovoalbúmina.

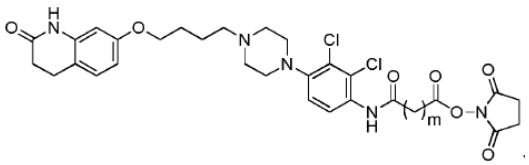
16. El conjugado de la Reivindicación 13 donde el compuesto es:



17. El conjugado de la Reivindicación 13 donde el compuesto es:



18. El conjugado de la Reivindicación 13 donde el compuesto es:



donde m es 2 o 3.

Fig. 1

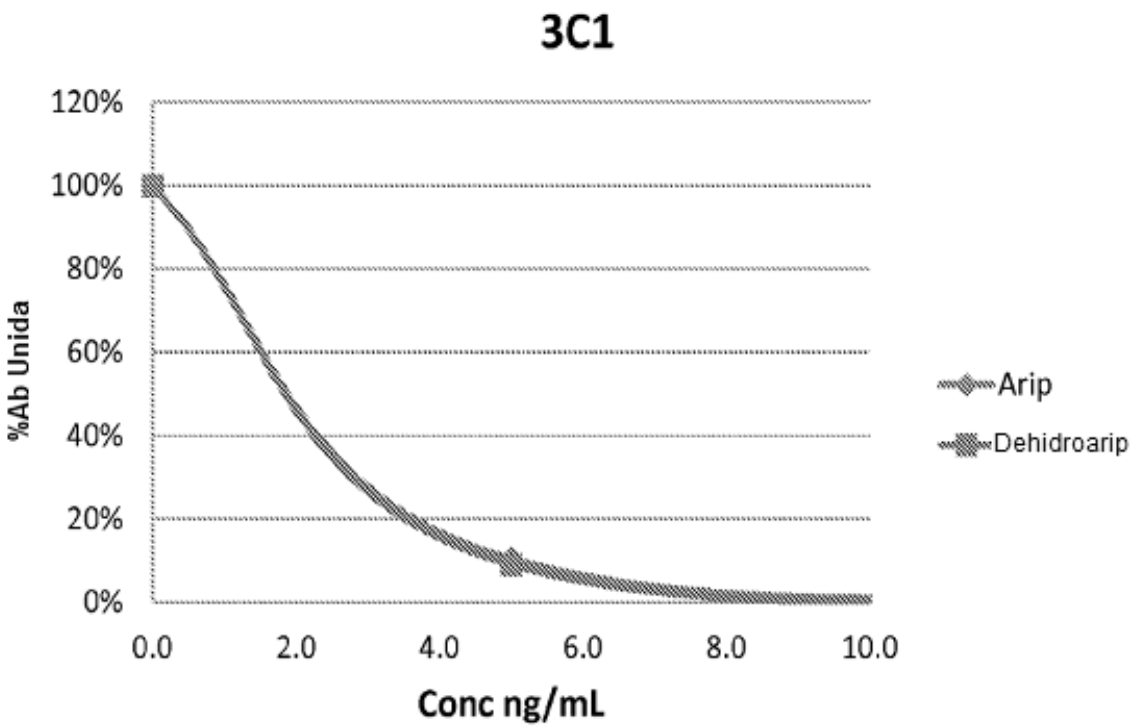

3C1
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
%Ab Unida
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
Conc ng/mL
Arip
Dehidroarip

Fig. 2

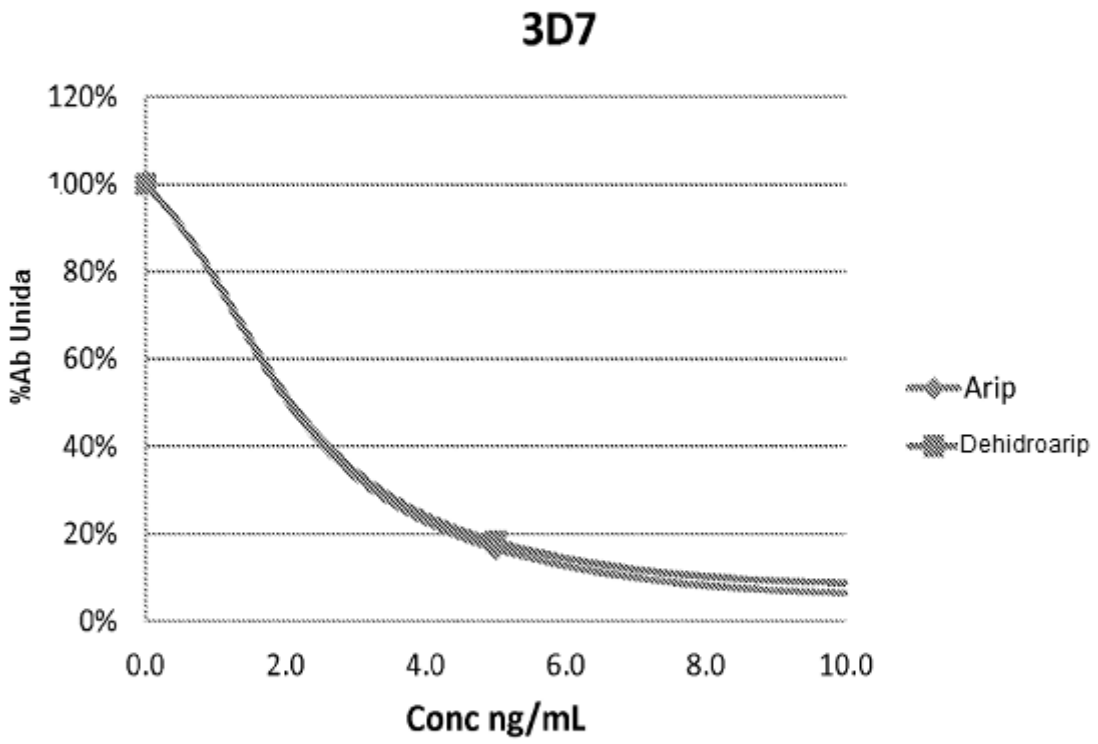

3D7
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
%Ab Unida
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
Conc ng/mL
Arip
Dehidroarip

Fig. 3

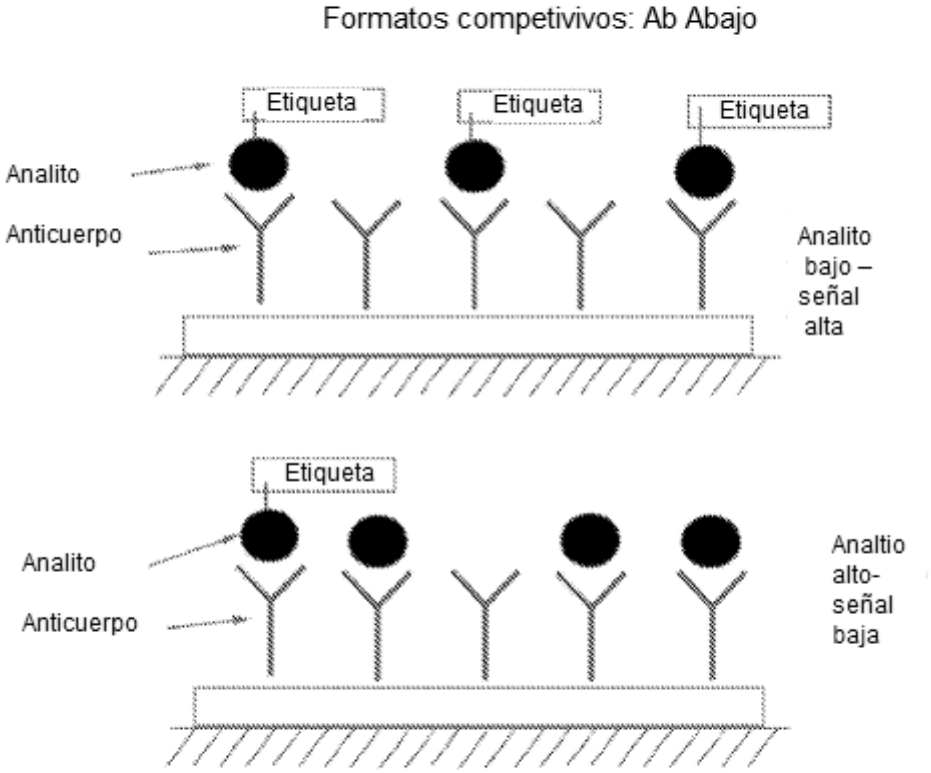

Formatos competivivos: Ab Abajo
Etiqueta
Etiqueta
Etiqueta
Analito
Anticuerpo
Analito bajo – señal alta
Etiqueta
Analito
Anticuerpo
Analtio alto- señal baja

Fig. 4

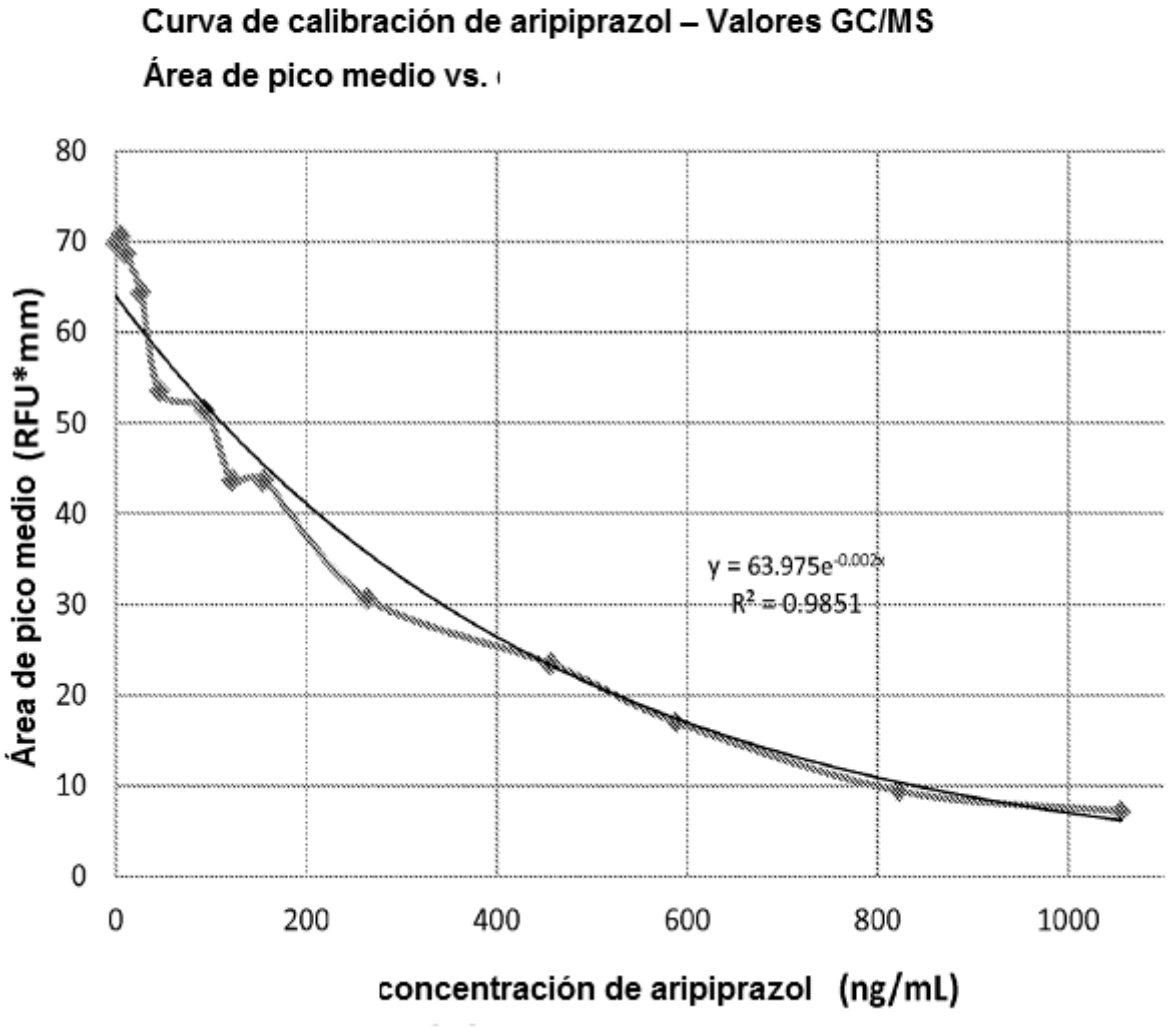
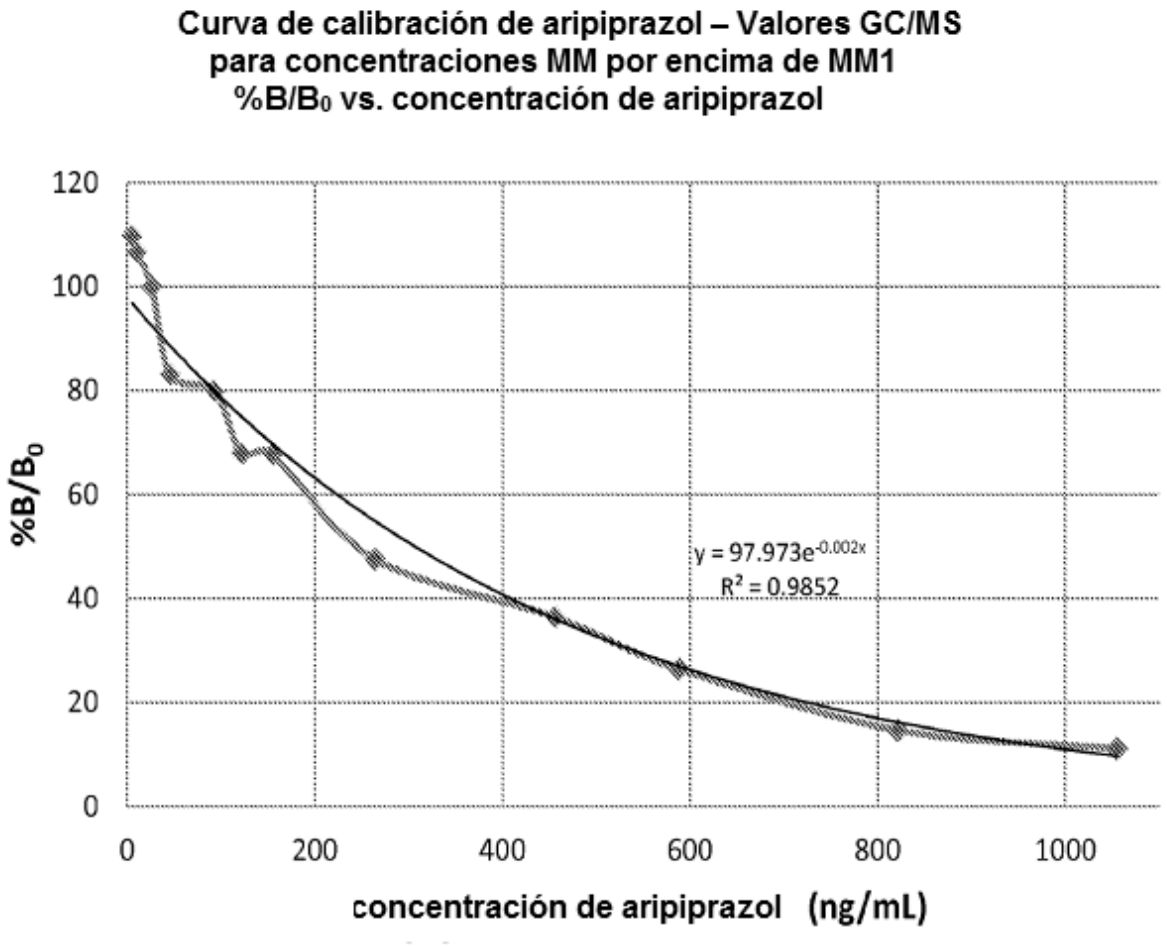

Curva de calibración de aripiprazol – Valores GC/MS
Área de pico medio vs.
Área de pico medio (RFU*mm)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
200
400
600
800
1000
y = 63.975e-0.002x
R² = 0.9851
concentración de aripiprazol (ng/mL)

Fig. 5


Curva de calibración de aripiprazol – Valores GC/MS
para concentraciones MM por encima de MM1
%B/B0 vs. concentración de aripiprazol
120
100
80
60
40
20
0
%B/B0
0
200
400
600
800
1000
concentración de aripiprazol (ng/mL)
y = 97.973e-0.002x
R² = 0.9852