

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 952**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013 PCT/US2013/055830**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031665**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 13830990 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2888286**

54 Título: **Anticuerpos para haptenos de quetiapina y uso de los mismos**

30 Prioridad:

21.08.2012 US 201261691598 P

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

24.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HRYHORENKO, ERIC;
SANKARAN, BANUMATHI;
DECORY, THOMAS R.;
TUBBS, THERESA;
COLT, LINDA;
REMMERIE, BART M.;
SALTER, RHYS;
DONAHUE, MATTHEW GARRETT y
GONG, YONG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 664 952 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).

Anticuerpos para haptenos de quetiapina y uso de los mismos**Descripción****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los inmunoensayos, y en particular a anticuerpos que enlazan con la quetiapina que se pueden usar en inmunoensayos para la detección de quetiapina.

10 Antecedentes

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico crónico y debilitante que afecta aproximadamente al 0,45-1% de la población mundial (van Os, J.; Kapur, S. "Schizophrenia" Lancet 2009, 374, 635-645). Los principales objetivos del tratamiento son lograr la remisión sostenida de los síntomas psicóticos, reducir el riesgo y las consecuencias de la recaída y mejorar el funcionamiento del paciente y la calidad de vida en general. Aunque muchos pacientes con esquizofrenia pueden lograr la estabilidad de los síntomas con los medicamentos antipsicóticos disponibles, el mal cumplimiento con la medicación es una razón común de recaída con los medicamentos orales administrados diariamente. Varios estudios (Abdel-Baki, A.; Ouellet-Plamondon, C.; Malla, A. "Pharmacotherapy Challenges in Patients with First-Episode Psychosis" Journal of Affective Disorders 2012, 138, S3-S14) que investiga los resultados del incumplimiento han demostrado que los pacientes con esquizofrenia que no toman su medicación según lo prescrito tienen mayores tasas de recaída, ingreso hospitalario y suicidio, así como un aumento de la mortalidad. Se estima que del 40 al 75% de los pacientes con esquizofrenia tienen dificultades para cumplir con 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. "Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia" New England Journal of Medicine 2005, 353(12), 1209-1223).

La monitorización terapéutica de fármacos (TDM) es la cuantificación de las concentraciones en suero o en plasma de fármacos, incluidos los fármacos antipsicóticos, para la monitorización y optimización del tratamiento. Dicha monitorización permite, por ejemplo, la identificación de pacientes que no están cumpliendo con su régimen de medicación, que no están alcanzando dosis terapéuticas, que no responden a dosis terapéuticas, que tienen una tolerabilidad subóptima, que tienen interacciones fármaco-fármaco farmacocinéticas, o que tienen un metabolismo anormal que resulta en concentraciones en plasma inapropiadas. Existe una considerable variabilidad individual en la capacidad del paciente para absorber, distribuir, metabolizar y excretar fármacos antipsicóticos. Tales diferencias pueden estar provocadas por enfermedad concurrente, edad, medicación concomitante o peculiaridades genéticas. Las diferentes formulaciones de fármacos pueden también influir en el metabolismo de los fármacos antipsicóticos. La TDM permite la optimización de dosis para pacientes individuales, mejorando los resultados terapéuticos y funcionales. La TDM permite además a un médico que prescribe asegurar el cumplimiento con las dosis prescritas y el logro de concentraciones en suero efectivas.

Hasta la fecha, los métodos para determinar los niveles de concentraciones en suero o en plasma de fármacos antipsicóticos implican el uso de cromatografía líquida (LC) con detección de UV o espectrometría de masas y radioinmunoensayos (ver, por ejemplo Woestenborghs et al., 1990 "On the selectivity of some recently developed RIA's" in Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis 20:241-246. Analysis of Drugs and Metabolites, Including Anti-infective Agents; Heykants et al., 1994 "The Pharmacokinetics of Risperidone in Humans: A Summary", J Clin Psychiatry 55/5, suppl:13-17; Huang et al., 1993 "Pharmacokinetics of the novel anti-psychotic agent risperidone and the prolactin response in healthy subjects", Clin Pharmacol Ther 54:257-268). Los radioinmunoensayos detectan una o ambas de risperidona y paliperidona. Salamone et al. en la Patente US Nº 8.088.594 divulgan un inmunoensayo competitivo para risperidona usando anticuerpos que detectan tanto risperidona como paliperidona, pero no metabolitos farmacológicamente inactivos. Los anticuerpos usados en el inmunoensayo competitivo se desarrollan contra un inmunógeno particular. ID Labs Inc. (Londres, Ontario, Canadá) comercializa un ELISA para la olanzapina, otro medicamento antipsicótico, que también utiliza un formato competitivo. Las Instrucciones de uso indican que el ensayo está diseñado con propósitos de selección y está destinado a uso forense o de investigación, y no está destinado específicamente para uso terapéutico. Las instrucciones recomiendan que todas las muestras positivas se confirmen con cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) e indican que el anticuerpo utilizado detecta olanzapina y clozapina (ver ID Labs Inc., "Instructions For Use Data Sheet IDEL-F083", Rev. Fecha 8 de agosto de 2011). Algunos de estos métodos, concretamente HPLC y GC/MS, pueden ser costosos y laboriosos, y generalmente sólo se realizan en laboratorios grandes o especializado que tienen el equipamiento apropiado.

Existe una necesidad de otros métodos para determinar los niveles de fármacos antipsicóticos, particularmente métodos que puedan realizarse en un consultorio médico del que prescribe (donde el tratamiento para un paciente individual se puede ajustar en consecuencia de una manera mucho más oportuna) y en otros entornos médicos que carecen de equipos de LC o GC/MS o que requieren resultados de pruebas rápidos.

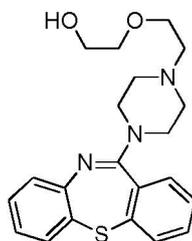
La WO 2011/082076 describe la síntesis y el uso de conjugados de quetiapina con aminoácidos estándar,

no estándar o sintéticos. La WO 2011/112657 describe la síntesis de conjugados de quetiapina con ácidos grasos. La WO 2011/115733 describe conjugados e inmunógenos derivados de risperidona o paliperidona, y métodos para producir anticuerpos enlazan selectivamente con paliperidona y risperidona y no con otros metabolitos.

5

La quetiapina es:

10



15

Sumario de la invención

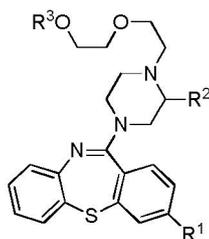
20

La presente invención está dirigida a un método para producir un anticuerpo que se enlaza con la quetiapina, el método comprendiendo (i) seleccionar un huésped no humano para la producción de anticuerpos; y (ii) inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico, en donde el huésped produce un anticuerpo que enlaza con quetiapina.

25

Formula I:

30



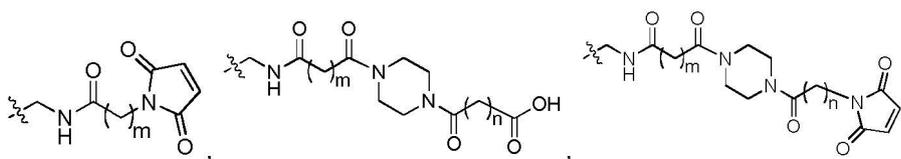
35

donde:

40

R es H,

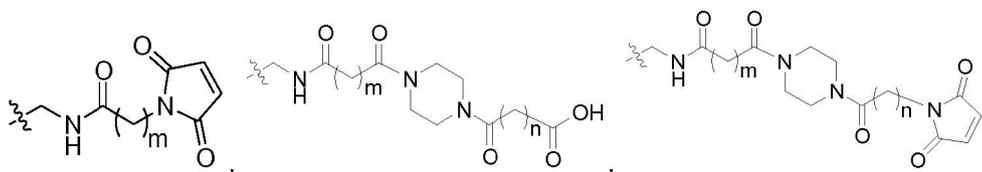
45



50

CH_2NH_2 , o $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$;
 R^2 es H,

55



60

CH_2NH_2 , o $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$;
 R^3 es H; siempre que o R^1 o R^2 sean H, y además siempre que tanto R^1 como R^2 no sean H al mismo tiempo;
 m es 1, 2, 3, 4 ó 5; y
 n es 1, 2, 3, 4 ó 5.

65

Las realizaciones actualmente preferidas del anticuerpo de la divulgación son los anticuerpos designados 11, 89-3, 89-5 y 89-13 generados contra el compuesto que tiene la Fórmula II. Otro inmunógeno adecuado es el compuesto que tiene la Fórmula III.

La Fig. 9 muestra una curva de dosis respuesta típica para un control positivo de risperidona generado con el anticuerpo 5-9 y un compañero de enlace competitiva de risperidona marcada;

La Fig. 10 muestra una curva de respuesta a dosis típica para una muestra que contiene aripiprazol generado con el anticuerpo 5C7 de aripiprazol en presencia de un compañero de enlace competitivo de aripiprazol marcado, sin curva de respuesta a dosis para olanzapina, quetiapina o risperidona en presencia de un compañero de enlace competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 11 muestra una curva de respuesta a dosis típica para una muestra que contiene olanzapina generada con el anticuerpo de olanzapina 4G9-1 en presencia de un compañero de enlace competitivo de olanzapina marcado, sin curva de respuesta a dosis para aripiprazol, quetiapina o risperidona en presencia de un compañero de enlace competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 12 muestra una curva de respuesta a dosis típica para una muestra que contiene quetiapina generada con el anticuerpo de quetiapina 11 en presencia de un compañero de enlace competitivo marcado con quetiapina, sin curva de respuesta a dosis para aripiprazol, olanzapina o risperidona en presencia de un compañero de enlace competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 13 muestra una curva de respuesta a dosis típica para una muestra que contiene risperidona generada con el anticuerpo de risperidona 5-9 en presencia de un compañero de enlace competitivo de risperidona marcado, sin curva de respuesta a dosis para aripiprazol, olanzapina o quetiapina en presencia de un compañero de enlace competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 14 muestra una curva de respuesta a dosis típica para una muestra que contiene aripiprazol generado con el anticuerpo 5C7 de aripiprazol en presencia de un compañero de enlace competitivo de aripiprazol marcado, sin curva de respuesta a dosis para olanzapina, quetiapina o risperidona en presencia de anticuerpo y compañero de enlace competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 15 muestra una curva de respuesta a dosis típica para una muestra que contiene olanzapina generada con el anticuerpo de olanzapina 4G9-1 en presencia de un compañero de enlace competitivo de olanzapina marcado, sin una curva de respuesta a dosis para aripiprazol, quetiapina o risperidona en presencia de anticuerpo y compañero de enlace competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 16 muestra una curva de respuesta a dosis típica para una muestra que contiene quetiapina generada con anticuerpo de quetiapina 11 en presencia de un compañero de enlace competitivo de quetiapina marcado, sin una curva de respuesta a dosis para aripiprazol, olanzapina o risperidona en presencia de anticuerpo y compañero de enlace competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 17 muestra una curva de respuesta a dosis típica para una muestra que contiene risperidona generada con anticuerpo de risperidona 5-9 en presencia de un compañero de enlace competitivo de risperidona marcado, sin curva de respuesta a dosis para aripiprazol, olanzapina o quetiapina en presencia de anticuerpo y compañero de enlace competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 18 muestra una comparación de la curva de respuesta a dosis de aripiprazol generada como un control positivo con la curva de respuesta a dosis de aripiprazol generada en el formato múltiple;

La Fig. 19 muestra una comparación de la curva de respuesta a dosis de olanzapina generada como un control positivo con la curva de respuesta a dosis de olanzapina generada en el formato múltiple;

La Fig. 20 muestra una comparación de la curva de respuesta a dosis de quetiapina generada como un control positivo con la curva de respuesta a dosis de quetiapina generada en el formato múltiple;

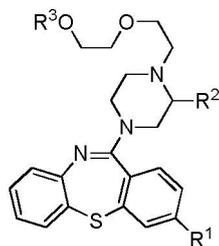
La Fig. 21 muestra una comparación de la curva de respuesta a dosis de risperidona generada como un control positivo con la curva de respuesta a dosis de risperidona generada en el formato múltiple.

Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas

La invención proporciona un método para producir un anticuerpo aislado que enlaza con la quetiapina. La invención proporciona además un kit de ensayo y un dispositivo de ensayo que comprende el anticuerpo. También se proporcionan métodos para producir una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo. Se proporciona además un método para detectar quetiapina en una muestra, que incluye un método de inmunoensayo competitivo.

En una realización, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico; o (ii) compite por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i).

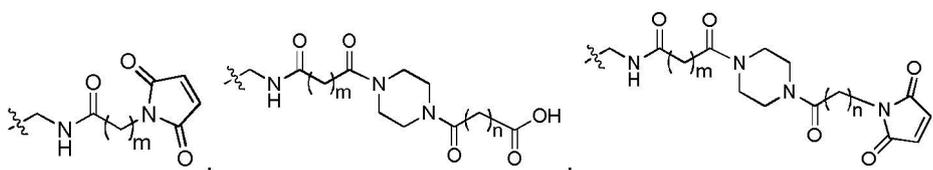
Formula I:



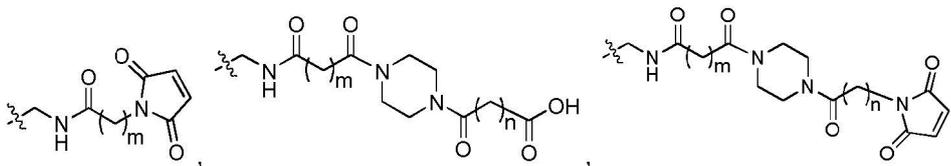
Formula I

en donde:

R¹ es H,



CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o
Z-(Y)_p-G;
R² es H,

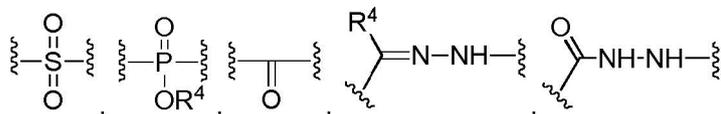


CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H,
o, Z-(Y)_p-G;
R³ es H, o W-(Y)_p-G; siempre que dos de R¹, R², R³ sean H, y además siempre que R¹, R² y R³ no sean todos H simultáneamente;

en donde:

Z se selecciona del grupo que consiste en:

-N(R⁴)-, -O-, -S-, -alquilo-, -aminoalquilo-, -tioalquilo-, -heteroalquilo-, -alquilcarbonilo-,



R⁴ es H, un grupo alquilo, grupo cicloalquilo, grupo aralquilo o grupo arilo sustituido o no sustituido;
en donde:

W se selecciona del grupo que consiste de:

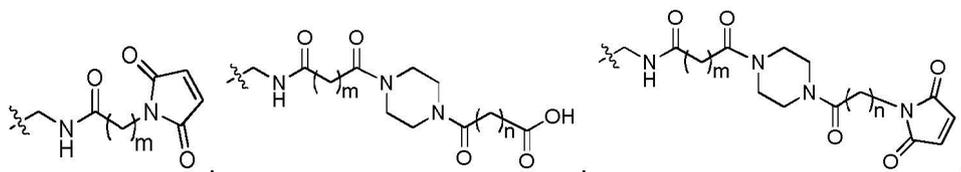
-C(O)-, -alquilo-, -aminoalquilo-, -tioalquilo-, -heteroalquilo-, -alquilcarbonilo-;
Y es un grupo espaciador orgánico;
G es un grupo de enlace funcional capaz de enlazar con un portador;
p es 0 ó 1;
m es 1, 2, 3, 4 ó 5;
n es 1, 2, 3, 4 ó 5.

En una realización adicional, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico; o (ii) compete por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i); en donde:

5

R¹ es H,

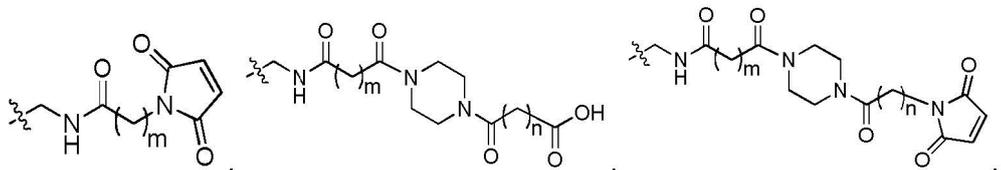
10



15

CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z(Y)_pG;
R² es H,

20



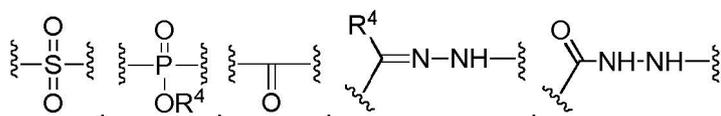
25

CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H,
o, Z-(Y)_p-G;
R³ es H, siempre que o R¹ o R² sean H, y además siempre que tanto R¹ como R² no sean H al mismo tiempo;
en donde:

30

Z se selecciona del grupo que consiste de: -N(R⁴)-, -O-, -S-, -alquilo-, -aminoalquilo-, -tioalquilo-, -heteroalquilo-, -alquilcarbonilo-,

35



40

R⁴ es H, un grupo alquilo, grupo cicloalquilo, grupo aralquilo o grupo arilo sustituido o no sustituido;
Y es un grupo espaciador orgánico;
G es un grupo de enlace funcional capaz de enlazar con un portador;
p es 0 ó 1;
m es 1, 2, 3, 4 ó 5;
n es 1, 2, 3, 4 ó 5.

45

En una realización adicional, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico; o (ii) compete por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i); en donde:

50

R¹ es H, o CH₂NH-(Y)_p-G;
R² es H, o CH₂NH-(Y)_p-G; siempre que o R¹ o R² sean H, y además siempre que tanto R¹ como R² no sean H al mismo tiempo;
R³ es H;
en donde:

55

Y es un grupo espaciador orgánico;
G es un grupo de enlace funcional capaz de enlazar con un portador;
p es 1.

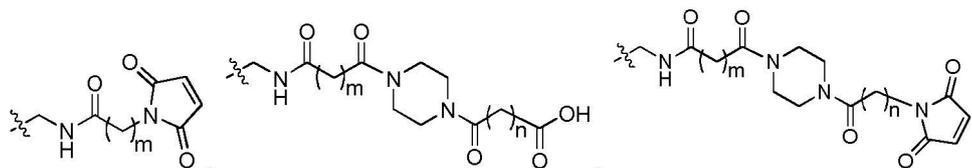
60

En una realización adicional, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico; o (ii) compete por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i); en donde:

65

R¹ es H,

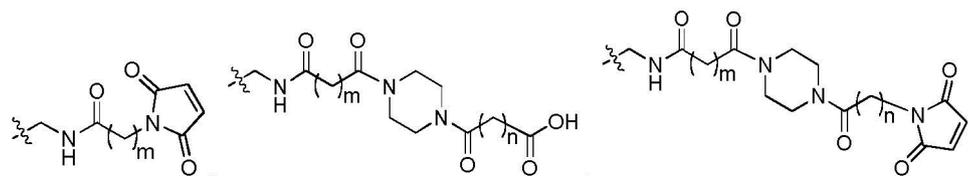
5



10

CH₂NH₂ , o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
R² es H,

15



20

CH₂NH₂ , o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H; siempre que o R¹ o R² sean H, y además siempre que tanto R¹ como R² no sean H al mismo tiempo;

R³ es H;
m es 1, 2, 3, 4 ó 5;

n es 1, 2, 3, 4 ó 5.

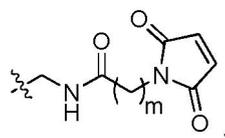
25

En una realización adicional, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico; o (ii) compite por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i); en donde:

30

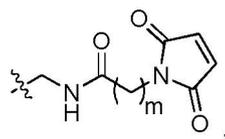
R¹ es H,

35



o CH₂NH₂ ;
R² es H,

40



45

o CH₂NH₂ ;siempre que o R¹ o R² sean H, y además siempre que tanto R¹ como R² no sean H al mismo tiempo;

R³ es H;
m es 1, 2, 3, 4 ó 5;

n es 1, 2, 3, 4 ó 5.

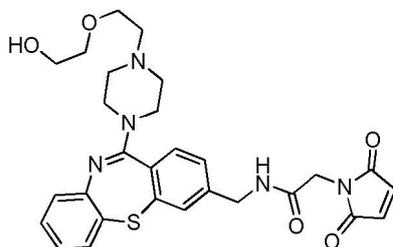
50

En una realización preferida, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula IV y un portador inmunogénico; o (ii) compite por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i).

55

Formula IV

60

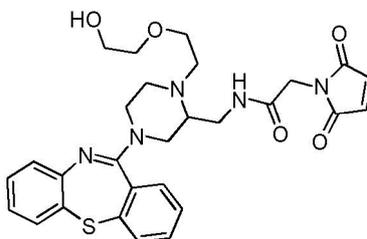


65

En una realización preferida, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula V y un portador inmunogénico; o (ii) compite por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i).

5

Formula V



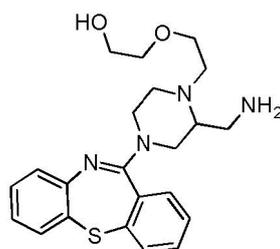
10

15

En una realización preferida, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula VI y un portador inmunogénico; o (ii) compite por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i).

20

Formula VI



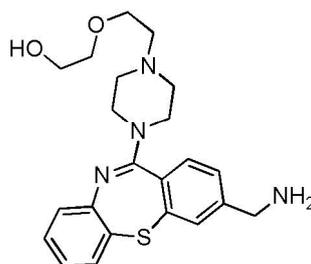
25

30

En una realización preferida, la presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula VII y un portador inmunogénico; o (ii) compite por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i).

35

Formula VII



40

45

50

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente divulgación se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto seleccionado de los compuestos de: Fórmula I, Fórmula IV, Fórmula V, Fórmula VI y Fórmula VII; y un portador inmunogénico.

55

Detalles adicionales de los compuestos descritos por las fórmulas anteriores y los conjugados formados por los compuestos y un portador inmunogénico se proporcionan en la sección siguiente titulada "Compuestos, Conjugados e Inmunógenos".

60

Detalles adicionales de los anticuerpos producidos en el método de la invención se proporcionan en la sección siguiente titulada "Anticuerpos".

65

La presente invención proporciona además un kit de ensayo que comprende el anticuerpo, así como un dispositivo de ensayo que comprende el anticuerpo. Preferiblemente, el dispositivo de ensayo es un dispositivo de ensayo de flujo lateral. Más detalles de los kits de ensayo y dispositivos de ensayo se proporcionan a continuación en la sección titulada "Kits y Dispositivos de Ensayo".

La invención proporciona un método para producir un anticuerpo que enlaza con la quetiapina, el método comprendiendo: (i) seleccionar una célula huésped no humana para la producción de anticuerpos; y (ii) inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico, en donde el huésped produce un anticuerpo que enlaza con la quetiapina. En realizaciones adicionales, el conjugado usado en el método puede ser un conjugado de un compuesto seleccionado de los compuestos de: Fórmula IV, Fórmula V, Fórmula VI y Fórmula VII; y un portador inmunogénico. Detalles adicionales sobre la producción de los anticuerpos de la presente invención se proporcionan en la sección siguiente titulada "Anticuerpos".

Se proporciona además un método para producir una línea celular de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal que enlaza con la quetiapina. El método comprende: (i) seleccionar un huésped no humano para la producción de anticuerpos; (ii) inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico; (iii) fusionar una línea celular del huésped inoculado con una célula que se divide continuamente para crear una célula fusionada capaz de producir un anticuerpo monoclonal que enlaza con la quetiapina; y (iv) clonar la célula fusionada para obtener una línea celular de hibridoma. En realizaciones adicionales, el conjugado usado en el método puede ser un conjugado de un compuesto seleccionado de los compuestos de: Fórmula IV, Fórmula V, Fórmula VI y Fórmula VII; y un portador inmunogénico. Detalles adicionales sobre la producción de hibridomas de acuerdo con la presente invención se proporcionan en la sección siguiente titulada "Anticuerpos".

La invención proporciona además un método para detectar quetiapina en una muestra. El método comprende: (i) poner en contacto una muestra con un anticuerpo producido por el método de la invención que está marcado con un marcador detectable, en donde el anticuerpo marcado y la quetiapina presentes en la muestra forman un complejo marcado; y (ii) detectar el complejo marcado para detectar quetiapina en la muestra. Detalles adicionales del método de detección de quetiapina de acuerdo con la presente invención se proporcionan en la sección siguiente titulada "Inmunoensayos".

Se proporciona además un método de inmunoensayo competitivo para detectar quetiapina en una muestra. El método comprende: (i) poner en contacto una muestra con un anticuerpo producido por el método de la invención, y con quetiapina o un compañero de enlace competitivo de quetiapina, en donde uno del anticuerpo y la quetiapina o un compañero de enlace competitivo de la misma está marcado con un marcador detectable, y en donde la quetiapina de la muestra compite con la quetiapina o el compañero de enlace competitivo de la misma para enlazar con el anticuerpo; y (ii) detectar el marcador para detectar la muestra de quetiapina. Detalles adicionales del método de inmunoensayo competitivo para detectar quetiapina de acuerdo con la presente invención se proporcionan en la sección siguiente titulada "Inmunoensayos".

En una realización preferida de la presente invención, la detección de quetiapina va acompañada por la detección de uno o más analitos además de la quetiapina. Preferiblemente, el uno o más analitos adicionales son fármacos antipsicóticos distintos a la quetiapina, y más preferiblemente los fármacos antipsicóticos distintos de la quetiapina se seleccionan del grupo que consiste de: aripiprazol, risperidona, paliperidona, olanzapina y metabolitos de los mismos.

Como se ha tratado anteriormente, los anticuerpos producidos por el método de la invención pueden usarse en ensayos para detectar la presencia y/o cantidad del fármaco antipsicótico en muestras de pacientes. Tal detección permite la monitorización de fármacos terapéuticos permitiendo todos los beneficios de los mismos. La detección de niveles de fármacos antipsicóticos puede ser útil para muchos propósitos, cada uno de los cuales representa otra realización de la presente invención, incluyendo: determinación del cumplimiento del paciente o cumplimiento con la terapia prescrita; uso como una herramienta de decisión para determinar si un paciente debería convertirse de un régimen antipsicótico oral a un régimen antipsicótico inyectable de acción prolongada; uso como una herramienta de decisión para determinar si el nivel de dosis o intervalo de dosificación de antipsicóticos orales o inyectables debe aumentarse o disminuirse para asegurar el logro o mantenimiento de niveles de fármaco eficaces o seguros; uso como una ayuda en el inicio de la terapia con fármacos antipsicóticos proporcionando evidencias de la consecución de niveles de pK mínimos; uso para determinar la bioequivalencia del fármaco antipsicótico en formulaciones múltiples o de múltiples fuentes; uso para evaluar el impacto de la polifarmacia y las interacciones fármaco-fármaco potenciales; y uso como una indicación de que un paciente debe ser excluido de o incluido en un ensayo clínico y como una ayuda en la monitorización posterior del cumplimiento a los requisitos de la medicación del ensayo clínico.

COMPUESTOS, CONJUGADOS E INMUNOGENOS

En relación con los compuestos y conjugados e inmunógenos, se usan las siguientes abreviaturas: AMAS es éster de N-(α -maleimidoacetoxi)succinimida; BINAP es 2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaptilo; Boc o BOC es *tert*-butoxicarbonilo; BTG es tiroglobulina bovina; Bu₃N es tributilamina; DCC es dicitclohexilcarbodiimida; DCM es diclorometano; DIEA es diisopropiletilamina; DMF es N,N-dimetilformamida; EDCI o EDC es clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; EDTA es ácido etilendiaminotetraacético; HOBt o HOBt es hidrato de 1-

hidroxibenzotriazol; KLH es hemocianina de lapa californiana; Pd₂(dba)₃ es tris(dibencilidenacetona) dipaladio(0); SATA es N-succinimidil S-acetiltioacetato; TEA o Et₃N es trietilamina; THF es tetrahidrofurano; TFA es ácido trifluoroacético; r.t. es temperatura ambiente; DEAD es dietilazodicarboxilato; DIC es diisopropilcarbodiimida; NHS es N-hidroxisuccinimida; TFP es Tetrafluorofenilo; PNP es p-nitrofenilo; TBTU es tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio; DEPBT es 3-(dietoxifosforilo)-1,2,3-benzotrazin-4 (3H)-ona; BOP-Cl es cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico; DTT es ditioeritrol.

El término "conjugado" se refiere a cualquier sustancia formada de la unión de partes separadas. Los conjugados representativos incluyen los formados por la unión de una molécula pequeña, como los compuestos de Fórmula I, y una molécula grande, como un portador o un polímero de poliamina, particularmente una proteína. En el conjugado, la molécula pequeña se puede unir 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 proteínas, que no es capaz de estimular la formación de anticuerpos, pero que sí reacciona con los anticuerpos. Los anticuerpos se forman acoplado un hapteno a un portador inmunogénico de alto peso molecular, y luego inyectando este producto acoplado, es decir, un inmunógeno, en 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 "portador inmunogénico", como se usa en la presente, es una sustancia inmunogénica, comúnmente una proteína, que se puede unir en una o más posiciones con haptenos, permitiendo de este modo la producción de anticuerpos que pueden enlazar con estos haptenos. Ejemplos de sustancias portadoras inmunogénicas incluyen, pero no están limitadas a, proteínas, glicoproteínas, poliamino-polisacáridos complejos, partículas y ácidos nucleicos que se reconocen como extraños y provocan de este modo una respuesta inmunológica del huésped no humano. Los poliamino-polisacáridos se pueden preparar a partir de polisacáridos usando cualquiera de los medios convencionales conocidos para esta preparación.

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

Los portadores inmunogénicos también pueden incluir poliamino-polisacáridos, que son polímeros de alto peso molecular desarrollados por condensaciones repetidas de monosacáridos. Los ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa, gomas de carbohidratos como goma arábiga, agar, y demás. El polisacárido también contiene residuos de poli(aminoácidos) y/o residuos de lípidos.

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

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

El término "derivado" se refiere a un compuesto químico o molécula hecha a partir de un compuesto original por 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 que un compuesto de referencia, pero la cadena de carbono del análogo es más larga o más corta que la del compuesto de referencia.

Un "marcador", "molécula detectora", "informador" o "marcador detectable" es cualquier molécula que produce, o se puede inducir que produzca, una señal detectable. El marcador puede conjugarse con un analito, inmunógeno, anticuerpo o con otra molécula, como un receptor o una molécula que puede enlazar con un receptor como un ligando, particularmente un hapteno o anticuerpo. Un marcador puede unirse directa o indirectamente por medio de una fracción de enlace o puente. Ejemplos no limitativos de marcadores incluyen isótopos radiactivos (por ejemplo, ¹²⁵I), enzimas (por ejemplo, β-galactosidasa, peroxidasa), fragmentos de enzimas, sustratos de enzimas,

inhibidores de enzimas, coenzimas, catalizadores, fluoróforos (por ejemplo, rodamina, isotiocianato de fluoresceína o FITC, o Dylight 649), colorantes, quimioluminiscentes y luminiscentes (p. ej., dioxetanos, luciferina), o sensibilizadores.

5 Como se usa en la presente, un "espaciador" se refiere a una porción de una estructura química que conecta dos o más subestructuras como haptenos, portadores, inmunógenos, marcadores o compañeros de enlace a través de un grupo de enlace funcional. Estos grupos espaciadores se componen de los átomos típicamente presentes y ensamblados de maneras que se encuentran típicamente en compuestos orgánicos y por lo tanto pueden denominarse "grupos espaciadores orgánicos". Los bloques de construcción químicos usados para ensamblar los espaciadores se describirán en lo sucesivo en esta solicitud.

15 Entre los espaciadores preferidos están cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas. Estas cadenas de carbono también pueden incluir uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos que reemplazan uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o en los extremos de las cadenas. Por "heteroátomos" se entienden átomos distintos del carbono que se eligen del grupo que consiste de oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, en donde los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación y pueden tener carbono u otros heteroátomos enlazados con ellos. El espaciador puede incluir también grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos de la cadena.

20 El número de átomos en el grupo espaciador se determina contando los átomos distintos de hidrógeno.

25 El número de átomos en una cadena dentro de un grupo espaciador se determina contando el número de átomos distintos de hidrógeno a lo largo de la ruta más corta entre las subestructuras que se conectan. Las longitudes de cadena preferidas están entre 1 y 20 átomos.

30 Un "grupo de enlace funcional" se refiere a un grupo reactivo que está presente en un hapteno y puede usarse para proporcionar un sitio reactivo disponible a través del cual la porción de hapteno puede acoplarse a otra fracción mediante la formación de un enlace químico covalente para producir un conjugado de un hapteno con otra fracción (como un marcador o portador). El hapteno puede unirse de esta manera a una fracción como biotina para formar un compañero de enlace competitivo.

35 Se pueden usar grupos espaciadores para enlazar el hapteno al portador. Espaciadores de diferentes longitudes permiten unir el hapteno con distancias diferentes del portador para su presentación en el sistema inmune del animal o ser humano inmunizado para la optimización del proceso de formación de anticuerpos. La unión a diferentes posiciones en la molécula de hapteno permite la oportunidad de presentar sitios específicos en el hapteno al sistema inmunitario para influir en el reconocimiento de anticuerpos. El espaciador puede contener grupos solubilizantes hidrófilos para hacer el derivado de hapteno más soluble en medios acuosos. Ejemplos de grupos solubilizantes hidrófilos incluyen, pero no están limitados a, grupos polioxialquilo, por ejemplo, cadenas de polietilenglicol; grupos hidroxilo, carboxilato y sulfonato.

40 El término "grupo nucleófilo" o "nucleófilo" se refiere a una especie que dona un par de electrones para formar un enlace químico en una reacción. El término "grupo electrófilo" o "electrófilo" se refiere a una especie que acepta un par de electrones de un nucleófilo para formar un enlace químico en una reacción.

45 El término "sustituido" se refiere a la sustitución de un átomo o grupo de átomos en lugar de un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono en cualquier posición en la molécula original. Ejemplos no limitativos de sustituyentes incluyen átomos de halógeno, grupos amino, hidroxilo, carboxilo, alquilo, arilo, heteroalquilo, heteroarilo, ciano, alcoxi, nitro, aldehído y cetona.

50 El término "alquilo" se refiere a radicales saturados o insaturados de cadena lineal y ramificada de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique lo contrario, y se pretende específicamente que incluya radicales que tengan cualquier grado o nivel de saturación. Alquilo incluye, pero no está limitado a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *tert*-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo y dodecilo.

55 El término "cicloalquilo" se refiere a un radical de anillo de hidrocarburo monocíclico o bicíclico saturado o parcialmente insaturado compuesto de 3 a 10 átomos de carbono. En el anillo pueden estar opcionalmente presentes sustituyentes alquilo. Los ejemplos incluyen ciclopropilo, 1,1-dimetilciclobutilo, 1,2,3-trimetilciclopentilo, ciclohexilo y ciclohexenilo.

60 El término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo que incluye uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos que reemplazan uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o en los extremos de las cadenas.

65

El término "aminoalquilo" se refiere a por lo menos un grupo amino primario o secundario enlazado a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

5 El término "alcoxi" se refiere a radicales de cadena lineal o ramificada de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique lo contrario, enlazados con un átomo de oxígeno. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi y butoxi.

10 El término "alcoxilalquilo" se refiere a por lo menos un grupo alcoxi enlazado con cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

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

15 El término "grupo carboxilato" incluye ácidos carboxílicos y ésteres de alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquil carboxilato.

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

25 El término "heteroarilo" se refiere a radicales de anillos aromáticos de 5 a 7 miembros mono- o de 8 a 10 miembros bicíclicos, cualquier anillo de los cuales puede consistir en uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O o S, donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación permitido. Los ejemplos incluyen bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzotienilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, pirazinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolinilo, tiazolilo y tienilo.

30 El término "arilo" se refiere a radicales de anillos aromáticos monocíclicos o bicíclicos que contienen de 6 a 12 carbonos en el anillo. Los sustituyentes 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 arilo. Los ejemplos incluyen bencilo, feniletilo o 2-naftilmetilo.

35 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" agrega el grupo $-C(O)R_a$ a una molécula.

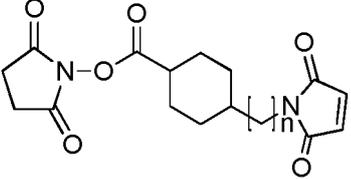
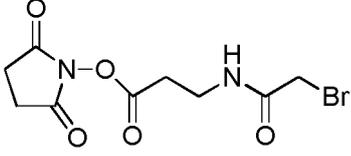
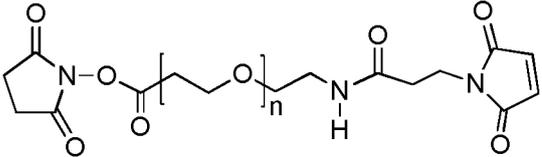
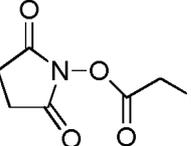
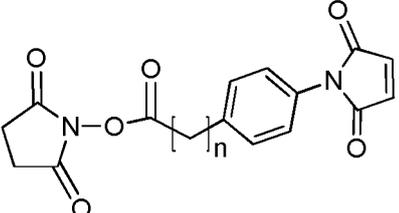
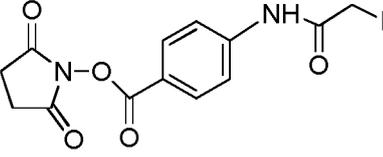
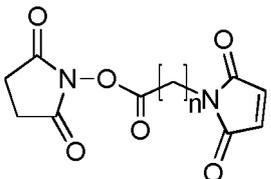
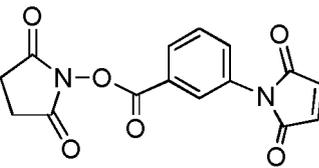
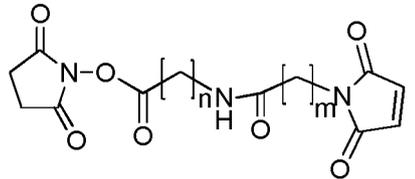
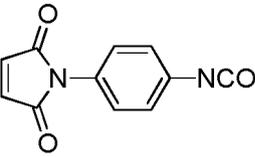
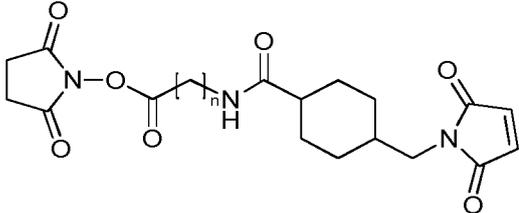
40 El término "sulfonilo" se refiere al grupo $-S(O)_2R_b$, donde R_b es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, haloalquilo, arilo, aralquilo y heteroarilo. Un "agente de sulfonilación", añade el grupo $(O)_2R_a$ a una molécula.

45 Los espaciadores que llevan grupos de enlace funcionales reactivos para la unión de haptenos a fracciones de portadores pueden prepararse por una amplia variedad de métodos. El espaciador puede formarse usando una molécula que se funcionaliza o activa diferencialmente con grupos en cada extremo para permitir la reacción secuencial selectiva con el hapteno y el portador, pero la misma fracción reactiva también puede usarse en ambos extremos. Los grupos seleccionados para la reacción con el hapteno y el grupo funcional de enlace que se enlazará con el portador están determinados por el tipo de funcionalidad en el hapteno y el portador con el que se va a enlazar el hapteno. Los espaciadores y los métodos de unión a haptenos y portadores incluyen, pero no están limitados a, los descritos por Brinkley, M., A., *Bioconjugate Chem.* 1992, 3:2-13, Hermanson, Greg T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, London, Amsterdam, Burlington, MA, USA, 2008 y *Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook*; disponible para descarga o solicitud de copia impresa de **Thermo Scientific** 3747 N Meridian Rd, Rockford, IL USA 61101, ph 800-874-3723 o en: <http://www.piercenet.com/> y las referencias dentro de la misma. Muchas moléculas diferencialmente activadas para la formación de grupos espaciadores están disponibles comercialmente de vendedores, por ejemplo **Thermo Scientific**.

55 Para los haptenos que llevan un grupo amino, los modos de unión del espaciador al hapteno incluyen la reacción de la amina en el hapteno con un bloque de construcción espaciador que lleva un haluro de acilo o un éster activo. Los "ésteres activos" se definen como ésteres que experimentan reacción con un grupo nucleófilo, por ejemplo un grupo amino, bajo condiciones leves para formar un ligamiento estable. Un ligamiento estable se define como aquel que permanece intacto bajo condiciones de uso adicionales, por ejemplo, pasos sintéticos posteriores, uso como un inmunógeno, o en un ensayo bioquímico. Un ejemplo preferido de un ligamiento estable es un enlace amida. Los ésteres activos y los métodos de formación se describen por Benoiton, N.L., en Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*, Thieme Stuttgart, New York, vol E22 sección 3.2:443 y Benoiton, N.L., *Chemistry of Peptide Synthesis*, Taylor and Francis, NY, 2006. Los ésteres activos preferidos incluyen éster de p-nitrofenilo (PNP), éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y éster de tetrafluorofenilo (TFP). Los haluros de acilo pueden prepararse por muchos métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, la reacción del ácido carboxílico con cloruro

de tionilo o cloruro de oxalilo, ver: Fieser, L.F. y Fieser, M. Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons, NY, 1967 y las referencias del mismo. Estos pueden convertirse a otros ésteres activos como ésteres de p-nitrofenilo (PNP) que también se pueden usar en espaciadores bi-funcionales activos como se describe por Wu et.al, Organic Letters, 2004, 6(24):4407. Los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) pueden prepararse por reacción de carbonato de N,N-disuccinimidilo (CAS 74124-79-1) con el ácido carboxílico de un compuesto en presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiletilamina en un solvente aprótico bajo condiciones anhidras como se describe en el Ejemplo 35 de la WO2012012595 o usando N-hidroxisuccinimida y dicitohexilcarbodiimida (DCC) u otro agente deshidratante, en condiciones anhidras. Los ésteres de tetrafluorofenilo (TFP) pueden prepararse por reacción de ácidos carboxílicos con 2,3,5,6-tetrafluorofeniltrifluoroacetato en presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiletilamina en un solvente aprótico en condiciones anhidras como se informa por Wilbur, et.al., Bioconjugate Chem., 2004, 15 (1): 203 . Un experto en la técnica reconocerá que los espaciadores mostrados en la Tabla 1, entre otros, pueden obtenerse usando métodos conocidos y unirse a haptenos que contienen amino utilizando optimización rutinaria de las condiciones de reacción. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno con un grupo tiol en un portador.

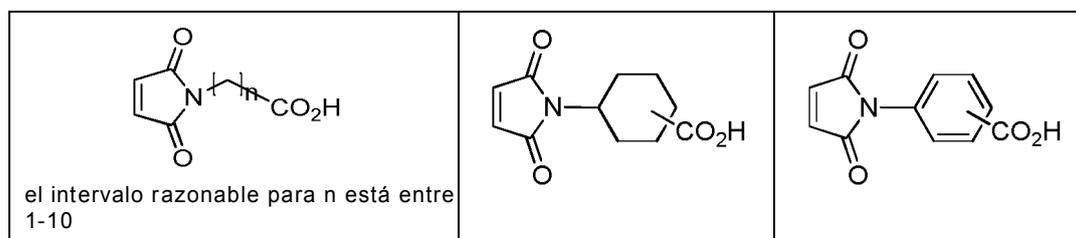
Tabla 1

| | |
|---|--|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  | <p>Los valores razonables para m y n están entre 1 y 10</p> |

También puede usarse el acoplamiento directo de la amina en el hapteno y una funcionalidad de ácido carboxílico en el bloque de construcción espaciador en presencia de un agente de acoplamiento como un modo de unión. Los reactivos preferidos son los usados típicamente en la síntesis de péptidos. Los reactivos de acoplamiento de péptidos incluyen, pero no están limitados a, tetrafluorborato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU, CAS N° 125700-67-6), ver: Pruhs, S., *Org. Process. Res. Dev.* 2006, 10:441; N-hidroxibenzotriazol (HOBT, CAS N° 2592-95-2) con un agente deshidratante de carbodiimida, por ejemplo N-N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC) o clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), ver: König W., Geiger, R. *Chem. Ber.*, 1970, 103 (3):788; 3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotrazin-4(3H)-ona (DEPBT, CAS N° 165534-43-0), ver: Liu, H. et.al., *Chinese Chemical Letters*, 2002, 13(7):601; cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico; (BOP-Cl, CAS N° 68641-49-6), ver: Diago-Meseguer, J et.al. *Synthesis*, 1980, 7:547-51 y otros descritos en detalle por Benoiton in *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005, Capítulo 2, y el boletín técnico proporcionado por **Advanced Automated Peptide Protein Technologies** (aapptec), 6309 Shepardsville Rd., Louisville KY 40228, ph 888 692 9111; www.aapptec.com y las referencias del mismo.

Estos métodos crean un ligamiento de amida estable que une el hapteno con el espaciador. Ejemplos de espaciadores que pueden obtenerse usando métodos conocidos y unirse a haptenos que contienen amino utilizando optimización rutinaria de las condiciones de reacción empleando los métodos descritos y citados anteriormente se muestran, pero no están limitados a los de la Tabla 2. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un portador.

Tabla 2



Los espaciadores también pueden construirse de forma escalonada mediante la unión secuencial de los grupos químicos apropiados al hapteno incluyendo el paso de formar el grupo de enlace funcional que es capaz de enlazar con el portador. Ver ejemplos ilustrativos en los Esquemas de Reacción Generales.

Adicionalmente, cuando el hapteno tiene un grupo nucleófilo, por ejemplo un grupo tiol, un grupo amino o un grupo hidroxilo que se convertirá en el punto de unión del espaciador, el espaciador también puede construirse por alquilación del grupo tiol, amina o hidroxilo. Se puede usar cualquier grupo alquilo que esté apropiadamente sustituido con una fracción capaz de experimentar una reacción de sustitución, por ejemplo, un haluro de alquilo, o un éster de ácido sulfónico como p-toluenosulfonato, para unir el espaciador. Muchos ejemplos de reacciones de alquilación son conocidos por los expertos en la técnica y pueden encontrarse ejemplos específicos en la bibliografía química general y optimizarse mediante experimentación rutinaria. Una exposición de las reacciones de alquilación con muchas referencias puede encontrarse en el Capítulo 10 de *Advanced Organic Chemistry* de March, Smith, M.B., y March, J., John Wiley & sons, Inc. NY, 2001. También pueden emplearse otros ligamientos como la reacción de la fracción nucleófila, por ejemplo una amina, en el hapteno con un isocianato para formar una urea o una reacción con un isotiocianato para formar un ligamiento de tiourea, ver: Li, Z., et.al., *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 2003, 178(2):293-297. Los espaciadores pueden unirse a haptenos que llevan grupos hidroxilo por reacción con grupos isocianato para formar ligamientos de carbamato o uretano. El espaciador puede activarse diferencialmente con el grupo funcional isocianato en un extremo y un grupo de enlace funcional capaz de reaccionar con el portador, ver: Annunziato, M.E., Patel, U.S., Ranade, M. and Palumbo, P.S., *Bioconjugate Chem.*, 1993, 4:212-218.

Para haptenos que llevan un grupo de ácido carboxílico, los modos de unión de una porción espaciadora al hapteno incluyen la activación del grupo de ácido carboxílico como un haluro de acilo o éster activo, ejemplos de los cuales se muestran en la Tabla 3, la preparación de los cuales se describe previamente, seguido por reacción con un amino (-NH₂-), hidrazino (-NH-NH₂-), hidrazido (-C(O)-NH-NH₂-) o grupo hidroxilo (-OH) en la porción espaciadora para formar un ligamiento de amida, hidrazida, diacilhidrazina o éster, o acoplamiento directo del grupo de ácido carboxílico con un grupo amino en la porción espaciadora o directamente en el portador con un reactivo de acoplamiento de péptidos y/o reactivo deshidratante de carbodiimida, descritos anteriormente, ejemplos de los cuales se muestran en las tablas 4 y 5. Los procedimientos encontrados en las referencias citadas anteriormente para la formación de ésteres activados y el uso de agentes de acoplamiento de péptidos pueden emplearse para la unión de haptenos que llevan ácido carboxílico para bloques de construcción espaciadores y portadores de proteínas con grupos amino disponibles utilizando optimización rutinaria de las condiciones de reacción. Tabla 3

Tabla 3

| | | | | |
|----|-----------------|-----|----------------------------------|------------|
| 5 | | | <p>X=Cl, Br Cloruro de acilo</p> | <p>PNP</p> |
| 10 | Sulfo NHS y NHS | TFP | | |

Tabla 4

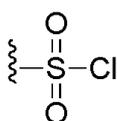
| | | | | |
|----|------|------|--------|------|
| 15 | | | | |
| 20 | HOBT | DEPT | BOP-Cl | TBTU |

Tabla 5

| | | | |
|----|-------------------------------|--------------------------------|---|
| 30 | | | |
| 35 | diisopropilcarbodiimida (DIC) | Diciclohexilcarbodiimida (DCC) | 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.HCl (EDC) |

Otros grupos electrófilos pueden estar presentes en el hapteno para unir el espaciador, por ejemplo, un haluro de sulfonilo

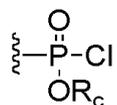
40



45

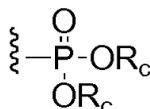
o grupo de fósforo electrófilo, por ejemplo:

50



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

55



60

R_c es alquilo, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo.

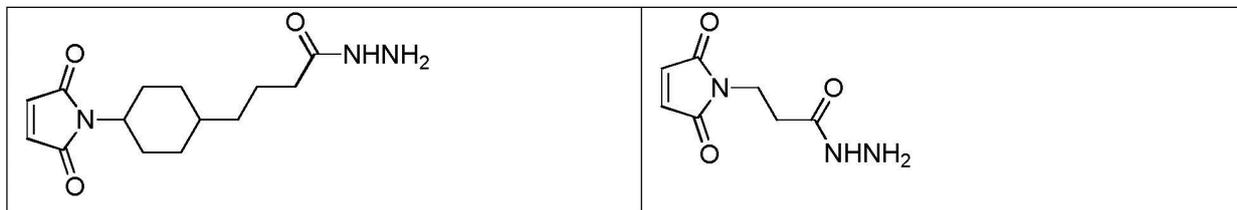
Ver: Aliouane, L., et.al, Tetrahedron Letters, 2011, 52(28):8681.

65

Los haptenos que llevan grupos aldehído o cetona pueden unirse a espaciadores usando métodos que incluyen, pero no están limitados a, reacción con un grupo hidrazida H₂N-NH-C(O)- en el espaciador para formar una

acilhidrazona, ver: Chamow, S.M., Kogan, T.P., Peers, D.H., Hastings, R.C., Byrn, R.A. and Askenaszi, A., J. Biol. Chem., 1992, 267(22): 15916. Los ejemplos de grupos espaciadores de hidrazida bifuncionales que permiten la unión a un grupo tiol en el portador se muestran en la Tabla 6.

5 Tabla 6

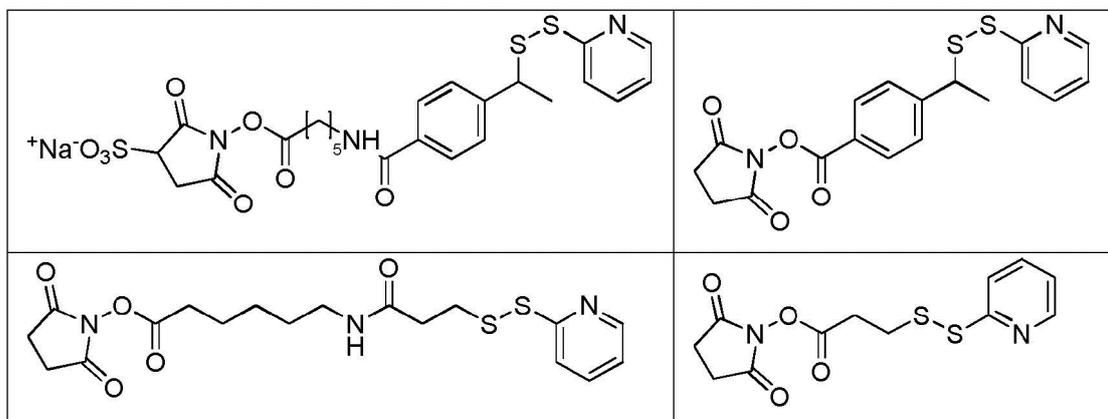


15 Los haptenos también pueden contener grupos tiol que pueden hacerse reaccionar con el portador siempre que el portador haya sido modificado para proporcionar un grupo que pueda reaccionar con el tiol. Los grupos portadores pueden modificarse mediante métodos que incluyen, pero no están limitados a, la unión de un grupo que contiene un grupo funcional maleimida por reacción de un grupo amino en el portador con maleimidoacetato de N-succinimidilo (AMAS, CAS N° 55750-61-3), yodoacetato de succinimidilo (CAS N° 151199-81-4), o cualquiera de los grupos espaciadores bifuncionales que se muestran en la Tabla 1 para introducir un grupo que puede experimentar una reacción que da como resultado la unión del hapteno al transportador.

25 El grupo de enlace funcional capaz de formar un enlace con el portador puede ser cualquier grupo capaz de formar un ligamiento estable y puede ser reactivo para varios grupos diferentes en el portador. El grupo de enlace funcional puede reaccionar preferiblemente con un grupo amino, un grupo de ácido carboxílico o un grupo tiol en el portador, o un derivado de los mismos. Ejemplos no limitativos del grupo de enlace funcional son un grupo de ácido carboxílico, haluro de acilo, éster activo (como se ha definido anteriormente), isocianato, isotiocianato, haluro de alquilo, grupo amino, grupo tiol, grupo maleimida, grupo acrilato ($H_2C=CH-C(O)-$) o grupo vinilsulfona ($H_2C=CH-SO_2-$) Vere: 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 espaciador diferencialmente activado que puede hacerse reaccionar paso a paso con el hapteno y el hapteno resultante derivado puede luego hacerse reaccionar con el portador. Alternativamente, el hapteno puede derivatizarse con un espaciador que lleve un grupo precursor que puede transformarse en el grupo de enlace funcional mediante una reacción posterior. Cuando el grupo de enlace funcional en el espaciador es un grupo amina o de ácido carboxílico, la reacción de acoplamiento con el grupo de ácido carboxílico o la amina en el portador puede llevarse a cabo directamente mediante el uso de reactivos de acoplamiento de péptidos de acuerdo con los procedimientos en las referencias citadas anteriormente para estos reactivos

40 Pueden usarse grupos disulfuro particulares, por ejemplo, piridildisulfuros, como el grupo de enlace funcional en el espaciador que puede experimentar intercambio con un grupo tiol en el portador para formar un ligamiento de mixto, ver: Ghetie, V., et al., Bioconjugate Chem., 1990, 1:24-31. Estos espaciadores se pueden unir por reacción del hapteno que lleva amina con un éster activo que está unido a un espaciador que lleva el grupo piridildisulfuro, ejemplos de los cuales incluyen, pero no están limitados a, los mostrados en la Tabla 7.

45 Tabla 7



65 Muy a menudo el portador es una proteína y los grupos ε-amino de los residuos de lisina pueden usarse para la unión, ya sea directamente por reacción con un grupo de enlace funcional reactivo con amina o después de

la derivatización con un grupo que contiene tiol, incluyendo *N*-succinimidilo *S*-acetiltioacetato, (SATA, CAS 76931-93-6), o un análogo de los mismos, seguido por la escisión del grupo acetato con hidroxilamina para exponer el grupo tiol para la reacción con el grupo de enlace funcional en el hapteno. Los grupos tiol también pueden introducirse en el portador mediante reducción de enlaces de disulfuro dentro de portadores de proteína con reactivos reductores suaves que incluyen, pero no están limitados a, 2-mercaptoetilamina, ver: Bilah, M., et al., *Bioelectrochemistry*, 2010, 80 (1): 49, reactivos de fosfina, ver: KKirley, T.L., *Analytical Biochemistry*, 1989, 180(2):231 o ditioeritritol (DTT, CAS 3483-12-3) Cleland, W., *Biochemistry*, 1964, 3:480-482.

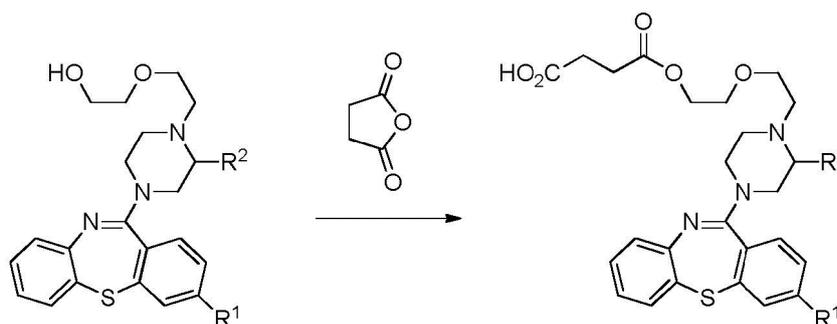
ESQUEMAS DE REACCIÓN GENERAL

Los compuestos útiles para producir anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos sintéticos generales descritos a continuación. Los compuestos de Fórmula (I) pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los siguientes esquemas de reacción solo pretenden representar ejemplos de la invención y de ninguna manera pretenden ser un límite de la invención.

Los derivados de quetiapina pueden prepararse por una variedad de métodos. El grupo hidroxilo primario en la quetiapina, el compuesto de partida (R_1 y $R_2 = H$) se muestra en el Esquema 1, puede acilarse usando, por ejemplo, anhídrido succínico y el método descrito por Fiedler, H., et al, *Langmuir*, 1994, 10:3959.

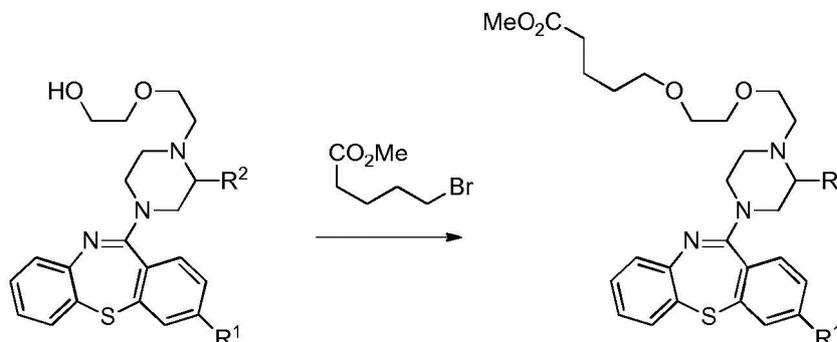
El ácido resultante se puede funcionalizar adicionalmente como se describe en otra parte en esta divulgación o unirse directamente a un portador usando cualquier número de los métodos mencionados anteriormente incluyendo los mostrados en los ejemplos posteriores.

Esquema 1

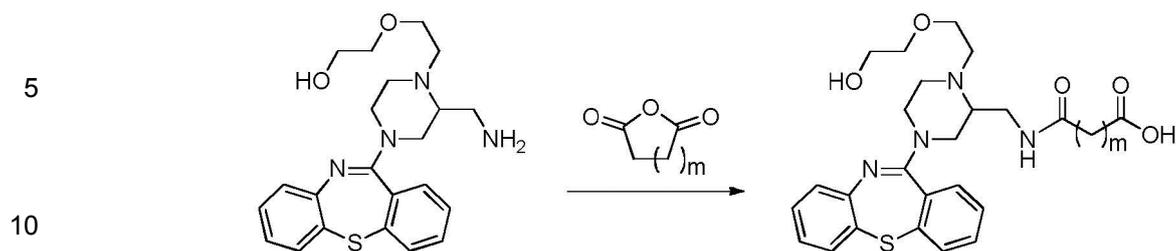


El grupo hidroxilo primario de quetiapina también puede alquilarse para formar un éter de acuerdo con el procedimiento de la US2010069356, como se muestra en el Esquema 2, usando un haluro de alquilo o un éster de sulfonato, como 4-bromometilpentanoato en presencia de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio e hidróxido de sodio acuoso para proporcionar un ácido que puede usarse como se ha descrito con anterioridad.

Esquema 2

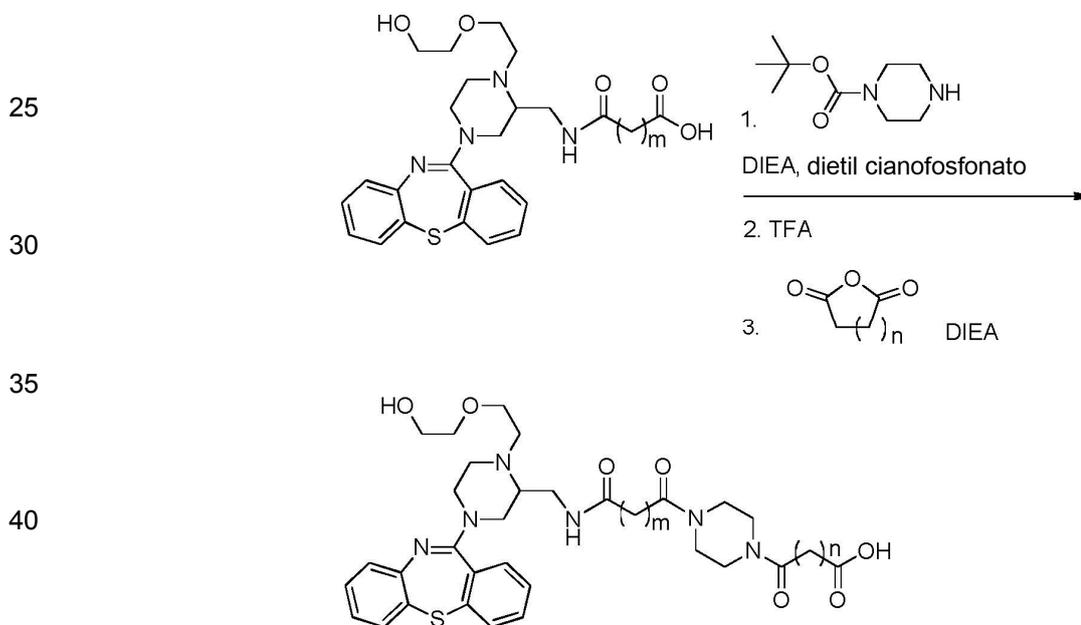


Esquema 3



15 Los compuestos de Fórmula I donde R^2 es $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ pueden prepararse de acuerdo con el Esquema 3. La reacción de 2-(2-(2-(aminometil)-4-(dibenzo[b],f][1,4]tiazepin-11-il)piperazin-1-il)etoxi)etanol, preparado como se describe en el Ejemplo 1, prosigue con un compuesto de anhídrido cíclico, como anhídrido succínico o anhídrido glutárico, en un solvente como piridina, a temperaturas que varían de la temperatura ambiente a 60°C , durante aproximadamente 48 horas. Los expertos en la técnica reconocerán que la misma química se puede usar para crear compuestos de Fórmula I donde R^1 es $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$.

Esquema 4



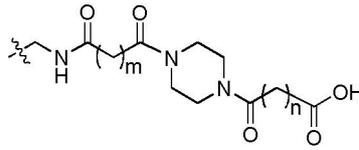
Los compuestos de Fórmula I donde R^2 es



55 se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 4. Los compuestos de Fórmula I, donde R^2 es $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, preparados como se describe en el esquema 1, se tratan con *N-t*-butoxicarbonylpiperazina, dietil cianofosfonato y una base, como diisopropiletamina. La reacción se lleva a cabo en un solvente, como diclorometano, durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La desprotección del grupo piperazinilo se realiza con anhídrido trifluoroacético como se describe en el Esquema 4, seguido por la reacción con un anhídrido apropiado, como anhídrido succínico o anhídrido maleico, en presencia de una base adecuada como diisopropiletamina. Los expertos en la técnica reconocerán que la misma química se puede usar para crear compuestos de Fórmula I donde R^1 es

65

5

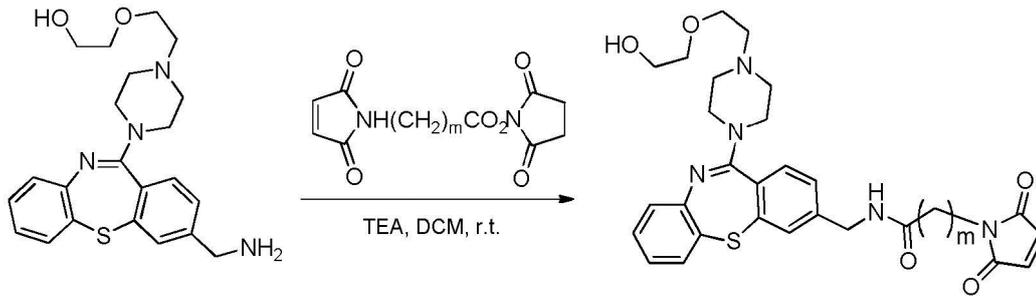


10

Esquema 5

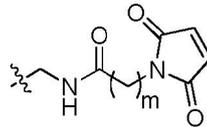
15

20



Los compuestos de Fórmula I donde R¹ es

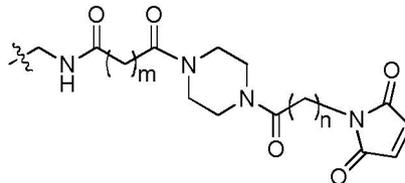
25



30

se puede hacer de acuerdo con el Esquema 5. La maleimida se puede introducir por cualquier método conocido en la técnica. Los grupos de funcionalización de maleimida como 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato donde m es 1, pueden usarse en un solvente como DMF o CH₂Cl₂, y una base, como tributilamina o trietilamina. Alternativamente, el grupo piperazinilo desprotegido descrito en el Esquema 4 se puede elaborar con una funcionalidad maleimida, como se describe en el Esquema 5 para dar compuestos de Fórmula I donde R¹ es

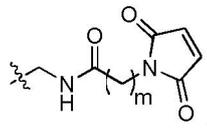
35



40

Los expertos en la técnica reconocerán que la misma química se puede usar para crear compuestos de Fórmula I donde R² es

45

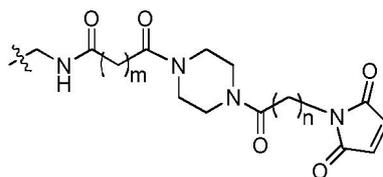


50

o

55

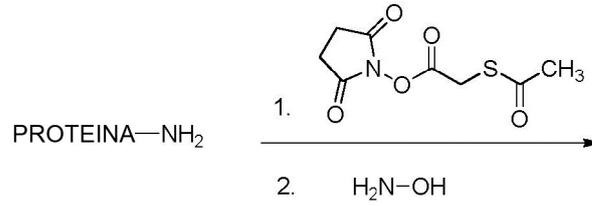
60



65

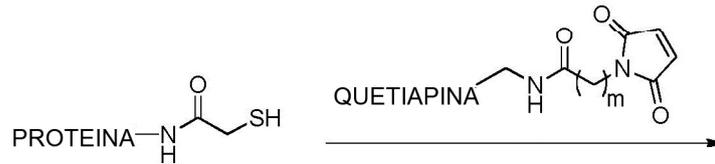
Esquema 6

5



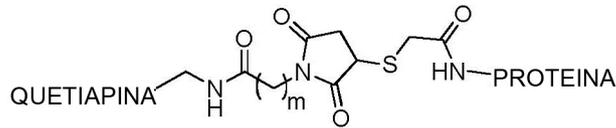
10

15



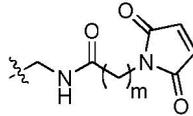
20

25



Los haptenos funcionalizados con maleimida en donde R¹ o R² es

30

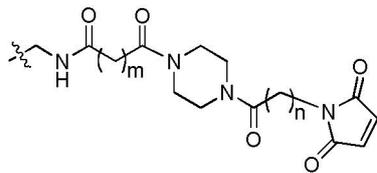


35

40

pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 6. La activación de los residuos de proteína lisina mediante acilación del épsilon-nitrógeno con N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), seguido de la hidrólisis posterior del grupo S-acetilo con hidroxilamina produce un grupo sulfhidrilo nucleófilo. La conjugación de la proteína activada por sulfhidrilo con el hapteno derivatizado con maleimida (preparado como se describe en el esquema general 3) prosigue mediante una reacción de adición de Michael. Las proteínas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina. La misma metodología se puede usar para conjugar proteínas con haptenos funcionalizados con maleimida donde R¹ o R² es

45



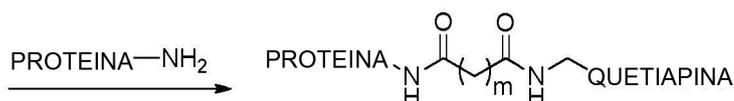
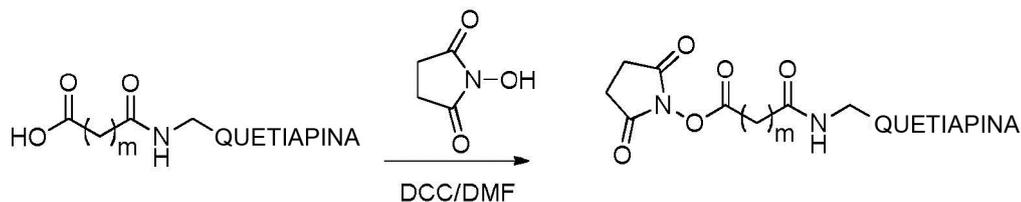
50

55

60

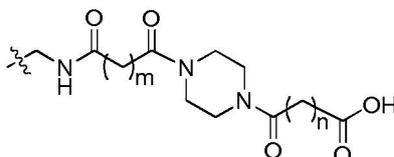
65

Esquema 7



Los haptenos funcionalizados con ácido carboxílico, donde R¹ o R² es CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H, pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 7. La reacción con N-hidroxisuccinimida y un agente de acoplamiento adecuado, como dicitohexilcarbodiimida, y una base, como tributilamina, en un solvente como DMF, a una temperatura de aproximadamente 20° C, durante aproximadamente 18 horas activa el ácido carboxílico con el grupo saliente de hidroxipirrolidina-2,5-diona. El conector activado y el hapteno pueden conjugarse luego con una proteína en un solvente, como un tampón de fosfato a pH 7.5, a aproximadamente 20° C, durante aproximadamente 2,5 horas. Las proteínas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina. La misma metodología se puede usar para conjugar proteínas con haptenos funcionalizados con ácido carboxílico donde R¹ o R² es

25



ANTICUERPOS

La presente divulgación está dirigida a un anticuerpo aislado o a un fragmento de enlace del mismo, que enlaza con quetiapina y que: (i) se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico; o (ii) compite por un epítipo que es el mismo que un epítipo enlazado por el anticuerpo de (i). El término "anticuerpo" se refiere a una proteína específica capaz de enlazar con un antígeno o porción del mismo (de acuerdo con esta invención, capaz de enlazar con un fármaco antipsicótico o metabolito del mismo). Se produce un anticuerpo en respuesta a un inmunógeno que puede haberse introducido en un huésped no humano, por ejemplo, un animal, por inyección. El término genérico "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos.

40

45

"Anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo de enlace con un antígeno" se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo, que compite con el anticuerpo intacto por el enlace. En términos generales, se dice que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que enlaza con un antígeno enlaza específicamente con un antígeno cuando la constante de disociación es menor de o igual a 1 μM, preferiblemente menor de o igual a 100 nM y lo más preferible menor de o igual a 10 nM. El enlace puede medirse por métodos conocidos por los expertos en la técnica, un ejemplo siendo el uso de un instrumento BIAcore™.

50

Los fragmentos de anticuerpo comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de enlace con el antígeno o la variable del anticuerpo intacto. Los fragmentos de enlace incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de enlace idénticos.

55

Como se usa en la presente, "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de enlazar específicamente con una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes de epítipos consisten habitualmente de agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que dos anticuerpos "enlazan con el mismo epítipo" si un anticuerpo demuestra que compite con el segundo anticuerpo en un ensayo de enlace competitivo, por cualquiera de los

60

65

métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (como el método BIAcore™ al que se ha hecho referencia anteriormente). En referencia a un hapteno (como quetiapina u otro fármaco antipsicótico), se puede generar un anticuerpo contra la molécula de hapteno no antigénica conjugando el hapteno con un portador inmunogénico. Luego se genera un anticuerpo que reconoce un "epítipo" definido por el hapteno. "Aislado" cuando se usa en el contexto de un anticuerpo significa alterado "por la mano del hombre" de cualquier estado natural; es decir, que, si es de origen natural, ha sido cambiado o eliminado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un anticuerpo de origen natural presente de forma natural en un animal vivo en su estado natural no está "aislado", pero el mismo anticuerpo separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", como se emplea aquí el término. Los anticuerpos pueden aparecer en una composición, como un reactivo de inmunoensayo, que no sean composiciones de origen natural, y permanecen en la misma anticuerpos aislados dentro del significado de ese término tal como se emplea en la presente.

"Reactividad cruzada" se refiere a la reacción de un anticuerpo con un antígeno que no se ha usado para inducir ese anticuerpo.

Preferiblemente, el anticuerpo producido en el método de la invención enlazará con el fármaco y con cualquier metabolito farmacológicamente activo deseado. Alterando la ubicación de la unión del portador inmunogénico con los compuestos de la invención, pueden diseñarse en los anticuerpos la selectividad y la reactividad cruzada con metabolitos. Para la quetiapina, puede ser deseable o no la reactividad cruzada con metabolitos de quetiapina como N-desalquilquetiapina (norquetiapina), sulfóxido de quetiapina, O-desalquilquetiapina o 7-hidroxi quetiapina. Pueden generarse anticuerpos que detectan múltiples de estos fármacos y/o metabolitos, o se pueden generar anticuerpos que detectan cada uno por separado (definiendo por tanto las propiedades de "enlace específico" del anticuerpo). Un anticuerpo enlaza específicamente con uno o más compuestos cuando su enlace del uno o más compuesto es equimolar o sustancialmente equimolar.

Los métodos para producir tales anticuerpos comprenden inocular a un huésped no humano con el conjugado descrito en la presente. Los huéspedes adecuados incluyen, pero no están limitados a, ratones, ratas, hámsters, conejillos de indias, conejos, pollos, burros, caballos, monos, chimpancés, orangutanes, gorilas y cualquier especie capaz de desarrollar una respuesta inmune madura. Los procedimientos de inmunización están bien establecidos en la técnica y se exponen en numerosos tratados y publicaciones incluyendo "The Immunoassay Handbook", 2ª Edición, editado por David Wild (Nature Publishing Group, 2000).

Preferiblemente, un inmunógeno que incorpora características de la presente invención se administra a un sujeto huésped no humano, por ejemplo, un animal, en combinación con un adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no están limitados a, adyuvante de Freund, hidróxido de aluminio en polvo (alumbre), hidróxido de aluminio junto con *Bordetella pertussis* y dicorinomicolato de monofosforil de lípido A-sintético de trehalosa (MPL-TDM).

Típicamente, se inyecta un inmunógeno o una combinación de un inmunógeno y un adyuvante en un huésped no humano mamífero mediante una o múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Preferiblemente, el programa de inmunización se lleva a cabo durante por lo menos una semana, y más preferiblemente, 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 Kohler y Milstein, por ejemplo, Nature 256:495-497 (1975). Los métodos de hibridoma implican típicamente inmunizar un huésped no humano o linfocitos de un huésped no humano, recolectando el anticuerpo monoclonal que secreta o tiene el potencial de secretar linfocitos, fusionando los linfocitos con células inmortalizadas y seleccionando células que secretan el anticuerpo monoclonal deseado.

Un huésped no humano puede inmunizarse para obtener 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 se prefieren células de bazo o linfocitos de otras fuentes mamíferas.

Los linfocitos se pueden fusionar 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, polietilenglicol. A modo de ilustración, pueden usarse células de mieloma de roedor, bovinas o humanas mutantes inmortalizadas por transformación. Se prefieren las poblaciones sustancialmente puras de células de hibridoma, en oposición a las células inmortalizadas sin fusionar. Por tanto, después de la fusión, las células pueden cultivarse en un medio adecuado que inhibe el crecimiento o la supervivencia de células no fusionadas, inmortalizadas, por ejemplo, usando células de mieloma mutantes que carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). En tal caso, pueden añadirse hipoxantina, aminopterina y timidina al medio (medio HAT) para evitar el crecimiento de células deficientes en HGPRT mientras que se permite que crezcan los hibridomas.

Preferiblemente, las células inmortalizadas que se fusionan eficientemente, se pueden aislar de poblaciones mixtas mediante selección en un medio como HAT, y que soportan la expresión estable y de alto nivel del anticuerpo después de la fusión.

5 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas incluyen líneas celulares de mieloma disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

10 Como las células de hibridoma secretan típicamente anticuerpos de manera extracelular, los medios de cultivo pueden ensayarse para la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para el fármaco antipsicótico. La inmunoprecipitación de ensayos de enlace *in vitro*, por ejemplo, el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), puede usarse para medir la especificidad de enlace de anticuerpos monoclonales.

15 Las células de hibridoma secretoras de anticuerpos monoclonales pueden aislarse como clones individuales mediante procedimientos de dilución limitante y sub-cultivando. Los medios de cultivo adecuados incluyen, pero no están limitados a, Medio Modificado de Eagle de Dulbecco, RPMI-1640, y medio libre de polipéptidos, reducido de polipéptidos, libre de suero, por ejemplo, Ultra DOMA PF o HL-1, disponible de Biowhittaker, Walkersville, MD. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis.

20 Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y/o purificar a partir de un medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina (Ig) convencionales incluyendo, pero no limitados a, polipéptido A-SEPHAROSE, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía por afinidad.

25 Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos recombinantes como los descritos en la Patente U.S. N° 4.166.452. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que enlazan específicamente con genes de cadenas de anticuerpos pesados y ligeras murinas, preferiblemente para sondear el ADN aislado de líneas celulares de hibridoma de anticuerpos monoclonales que secretan anticuerpos específicos para fármacos antipsicóticos.

35 También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de enlace específicos para el fármaco antipsicótico. Tales fragmentos incluyen, pero no están limitados a, los fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes de disulfuro de fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión Fab para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse et al., Science 256:1270-1281 (1989)). Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden todos expresarse y secretarse de *Escherichia coli*, permitiendo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos.

40 Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., BioTechnology 10:163-167 (1992)). Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos son conocidas por los expertos en la técnica. También se conciben fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) (ver Patentes U.S. N° 5.761.894 y N° 5.587.458) Los fragmentos Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, es probable que muestren enlace no específico reducido. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente U.S. N° 5.642.870, por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

50 KITS Y DISPOSITIVOS DE ENSAYO

También se puede proporcionar un kit de ensayo (también referido como kit reactivo) que comprende un anticuerpo como se ha descrito con anterioridad. Un kit de reactivo representativo puede comprender un anticuerpo que enlaza con el fármaco antipsicótico, quetiapina, un complejo que comprende un análogo de un fármaco antipsicótico o un derivado de los mismos acoplado a una fracción de marcador, y opcionalmente también puede comprender uno o más calibradores que comprenden una cantidad conocida de un fármaco antipsicótico o un estándar relacionado.

60 La frase "kit de ensayo" se refiere a un conjunto de materiales y reactivos que se usa para realizar un ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse en combinación empaquetada en el mismo recipiente o en recipientes separados, dependiendo de sus reactividades cruzadas y estabildades, y en forma líquida o liofilizada. Las cantidades y proporciones de reactivos proporcionados en el kit pueden seleccionarse para proporcionar resultados óptimos para una aplicación particular. Un kit de ensayo que incorpora características de la presente invención comprende anticuerpos que enlazan con la quetiapina. El kit puede comprender además compañeros de enlace competitivos de quetiapina y materiales de calibración y control.

65

5 La frase "material de calibración y control" se refiere a cualquier material estándar o de referencia que contiene una cantidad conocida de un analito. Una muestra que se sospecha contiene un analito y el material de calibración correspondiente se analiza bajo condiciones similares. La concentración de analito se calcula comparando los resultados obtenidos para el espécimen desconocido con los resultados obtenidos para el estándar. Esto se hace comúnmente construyendo una curva de calibración.

10 Los anticuerpos producidos por el método de la invención pueden incluirse en un kit, recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para su utilización. Cuando los anticuerpos se suministran en un kit, los diferentes componentes del inmunoensayo pueden envasarse en recipientes separados y mezclarse antes del uso. Dicho envasado de los componentes por separado puede permitir el almacenamiento a largo plazo sin disminuir sustancialmente el funcionamiento de los componentes activos. Además, los reactivos pueden envasarse en entornos inertes, por ejemplo, bajo una presión positiva de gas nitrógeno, gas argón o similar, que se prefiere especialmente para reactivos que son sensibles al aire y/o a la humedad.

15 Los reactivos incluidos en kits que incorporan características de la presente invención pueden suministrarse en todo tipo de recipientes de manera que las actividades de los diferentes componentes se conserven sustancialmente mientras que los componentes mismos no se adsorben o alteran sustancialmente por los materiales del recipiente.

20 Los recipientes adecuados incluyen, pero no están limitados a, ampollas, botellas, tubos de ensayo, viales, matraces, jeringuillas, sobres, por ejemplo, forrados con papel de aluminio, y similares. Los recipientes pueden estar compuestos de cualquier material adecuado incluyendo, pero no limitados a, vidrio, polímeros orgánicos, por ejemplo, policarbonato, poliestireno, polietileno, etc., cerámica, metal, por ejemplo, aluminio, aleaciones de metales, por ejemplo, acero, corcho y similares. Adicionalmente, los recipientes pueden comprender uno o más puertos de acceso estériles, por ejemplo, para acceder a través de una aguja, como puede proporcionarse mediante un tabique. Los materiales preferidos para los tabiques incluyen caucho y politetrafluoroetileno del tipo vendido con el nombre comercial TEFLON por DuPont (Wilmington, DE). Adicionalmente, los recipientes pueden comprender dos o más compartimentos separados por divisiones o membranas que pueden retirarse para permitir el mezclado de los componentes.

25 Los kits de reactivos que incorporan las características de la presente invención también pueden suministrarse con materiales de instrucción. Las instrucciones pueden ser impresas, por ejemplo, en papel y/o se pueden suministrar en un medio de lectura electrónica. Alternativamente, las instrucciones se pueden proporcionar dirigiendo a un usuario a una página web de Internet, por ejemplo, especificado por el fabricante o distribuidor del kit y/o por correo electrónico.

30 El anticuerpo también puede proporcionarse como parte de un dispositivo de ensayo. Tales dispositivos de ensayo incluyen dispositivos de ensayo de flujo lateral. Un tipo común de dispositivo de ensayo de flujo lateral desechable incluye una zona o área para recibir la muestra líquida, una zona conjugada y una zona de reacción. Estos dispositivos de ensayo se conocen comúnmente como tiras de prueba de flujo lateral. Emplean un material poroso, por ejemplo, nitrocelulosa, que define una trayectoria para el flujo de fluido capaz de soportar el flujo capilar. Los ejemplos incluyen los mostrados en las Patentes U.S. N° 5.559.041, 5.714.389, 5.120.643, y 6.228.660.

35 Otro tipo de dispositivo de ensayo es un dispositivo de ensayo no poroso que tiene proyecciones para inducir el flujo capilar. Los ejemplos de tales dispositivos de ensayo incluyen el dispositivo de flujo lateral abierto como se divulga en las Publicaciones Internacionales de PCT N° WO 2003/103835, WO 2005/089082, WO 2005/118139, and WO 2006/137785.

40 En un dispositivo de ensayo no poroso, el dispositivo de ensayo generalmente tiene por lo menos una zona de adición de muestras, por lo menos una zona conjugada, por lo menos una zona de reacción y por lo menos una zona de drenaje. Las zonas forman una trayectoria de flujo por la cual fluye la muestra desde la zona de adición de muestras a la zona de drenaje. También se incluyen elementos de captura, como anticuerpos, en la zona de reacción, capaces de enlazar con el analito, opcionalmente depositados en el dispositivo (como por recubrimiento); y un material conjugado marcado capaz también de participar en reacciones que permitirán la determinación de la concentración del analito, depositado en el dispositivo en la zona conjugada, en donde el material conjugado marcado lleva un marcador para su detección en la zona de reacción.

45 El material conjugado se disuelve a medida que la muestra fluye a través de la zona conjugada formando un penacho conjugado de material conjugado marcado disuelto y muestra que fluye corriente abajo a la zona de reacción.

50 A medida que el penacho conjugado fluye a la zona de reacción, el material conjugado será capturado por los elementos de captura, como a través de un complejo de material conjugado y analito (como en un ensayo "sándwich") o directamente (como en un ensayo "competitivo"). El material conjugado disuelto no enlazado se

barrerá pasada la zona de reacción en la por lo menos una zona de drenaje. Dichos dispositivos pueden incluir proyecciones o micropilares en la trayectoria del flujo.

5 Un instrumento como el divulgado en las Publicaciones de Patente US N° US20060289787A1 y US 20070231883A1 y la Patentes US N° 7.416.700 y 6.139.800, es capaz de detectar el material conjugado enlazado en la zona de reacción. Los marcadores comunes incluyen colorantes fluorescentes que pueden detectarse mediante instrumentos que excitan los colorantes fluorescentes e incorporan un detector capaz de detectar los colorantes fluorescentes.

10 INMUNOENSAYOS

Los anticuerpos así producidos pueden usarse en inmunoensayos para reconocer/enlazar con el fármaco antipsicótico, detectando de ese modo la presencia y/o cantidad del fármaco en una muestra del paciente. Preferiblemente, el formato de ensayo es un formato de inmunoensayo competitivo. Dicho 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).

20 El término "analito" se refiere a cualquier sustancia o grupo de sustancias, cuya presencia o cantidad se debe determinar. Los analitos de fármacos antipsicóticos representativos incluyen, pero no están limitados a, risperidona, paliperidona, olanzapina, aripiprazol y quetiapina.

25 El término "compañero de enlace competitivo" se refiere a una sustancia o grupo de sustancias, como las que se pueden emplear en un inmunoensayo competitivo, que se comportan de manera similar a un analito con respecto a la afinidad de enlace con un anticuerpo. Los compañeros de enlace competitivos representativos incluyen, pero no están limitados a, derivados de fármacos antipsicóticos y similares.

30 El término "detectar" cuando se usa con un analito se refiere a cualquier método cuantitativo, semi-cuantitativo o cualitativo, así como a todos los demás métodos para determinar un analito en general, y un fármaco antipsicótico en particular. Por ejemplo, un método que simplemente detecta la presencia o ausencia de un fármaco antipsicótico en una muestra se encuentra dentro del alcance de la presente invención, al igual que los métodos que proporcionan datos sobre la cantidad o concentración del fármaco antipsicótico en la muestra. Los términos "detectar", "determinar", "identificar" y similares se usan como sinónimos en la presente, y todos se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

35 Una realización preferida de la presente invención es un inmunoensayo competitivo en donde los anticuerpos que enlazan con el fármaco antipsicótico, o el fármaco o compañero de enlace competitivo del mismo, se unen a un soporte sólido (como la zona de reacción en un dispositivo de ensayo de flujo lateral) y el fármaco marcado o el compañero de enlace competitivo del mismo, o el anticuerpo marcado, respectivamente, y una muestra derivada del huésped no humano se pasan sobre el soporte sólido y la cantidad de marcador detectada unida al soporte sólido puede correlacionarse con una cantidad de fármaco en la muestra.

45 Cualquier muestra que sea sospechosa de contener un analito, por ejemplo, un fármaco antipsicótico, puede analizarse de acuerdo con los métodos de las realizaciones actualmente preferidas. La muestra puede pretratarse si se desea y puede prepararse en cualquier medio conveniente que no interfiera con el ensayo. Preferiblemente, la muestra comprende un medio acuoso como un fluido corporal de un huésped no humano, más preferiblemente plasma o suero.

50 Debe entenderse que se contemplan todas las maneras de inmunoensayos que emplean anticuerpos para su uso de acuerdo con las realizaciones actualmente preferidas, incluyendo ensayos en los que los anticuerpos están enlazados con fases sólidas y ensayos en los que los anticuerpos están en medios líquidos. Los métodos de inmunoensayos que pueden usarse para detectar analitos usando anticuerpos producidos por el método de la invención incluyen, pero no están limitados a, ensayos competitivos (reactivos limitados) en donde el analito marcado (analito análogo) y el analito en una muestra compiten por anticuerpos y ensayos inmunométricos de sitios individuales en donde el anticuerpo está marcado; y similares.

55 La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención por referencia a realizaciones específicas.

60 Todos los ejemplos se llevaron a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describe lo contrario en detalle. Las técnicas de biología molecular rutinarias de los siguientes ejemplos pueden llevarse a cabo como se describe en manuales de laboratorio estándar, como Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).

65 Las solicitudes en trámite tituladas "Haptens of Aripiprazole" (Expediente del Apoderado N°

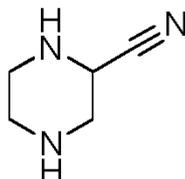
PRD3265USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,450, presentada el 21 de agosto del 2012), "Haptens of Olanzapine" (Expediente del Apoderado N° PRD3266USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,454, presentada el 21 de agosto del 2012), "Haptens of Paliperidone" (Expediente del Apoderado N° PRD3267USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,459, presentada el 21 de agosto del 2012),
 5 "Haptens of Quetiapine" (Expediente del Apoderado N° PRD3268USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,462, presentada el 21 de agosto del 2012), "Haptens of Risperidone and Paliperidone" (Expediente del Apoderado N° PRD3269USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,469, presentada el 21 de agosto del 2012), "Antibodies to Aripiprazole Haptens and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5128USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,544, presentada el 21 de agosto del 2012), "Antibodies to Olanzapine Haptens and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5132USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,572, presentada el 21 de agosto del 2012), "Antibodies to Paliperidone Haptens and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5126USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,634, presentada el 21 de agosto del 2012), "Antibodies to Risperidone Haptens and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5130USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,615, presentada el 21 de agosto del 2012),
 15 "Antibodies to Aripiprazole and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5129USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,522, presentada el 21 de agosto del 2012), "Antibodies to Olanzapine and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5133USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,645, presentada el 21 de agosto del 2012), "Antibodies to Paliperidone and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5127USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,692, presentada el 21 de agosto del 2012), "Antibodies to Quetiapine and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5135USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,659, presentada el 21 de agosto del 2012), "Antibodies to Risperidone and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5131USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/691,675, presentada el 21 de agosto del 2012), y "Antibodies to Risperidone and Use Thereof" (Expediente del Apoderado N° CDS5145USPSP, Solicitud de Patente Provisional US N° 61/790,880, presentada el 15 de marzo del 2013) son referidas en la presente

EJEMPLO 1

2-(2-(2-(aminometil)-4-(dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)piperazin-1-il)etoxi)etanol

Paso A

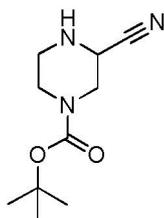
Piperazina-2-carbonitrilo



Se trató gota a gota una solución agitada de tetrahydrofurano (300 ml) y etilendiamina (108,2 g) a 30° C con 2-cloroacrilonitrilo (105,0 g) durante un período de 2 horas y se agitó durante 6 horas adicionales a 30° C. La mezcla de la reacción se enfrió a 20° C y se formó un precipitado. La reacción se filtró, y el filtrado se ajustó a pH 4 añadiendo ácido clorhídrico al 35%. El precipitado resultante se recogió por filtración. Los precipitados combinados se disolvieron en una solución de ácido clorhídrico al 20% y luego se vertieron en una solución de THF para precipitar el compuesto del título, que se secó a presión reducida y se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. ¹H NMR: (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) 5.00-4.97 (m, 1H), 3.79 (d, J=4.8 Hz, 2H), 3.62-3.44 (m, 4H).

Paso B

terc-Butil 3-cianopiperazina-1-carboxilato



A una solución del compuesto de piperazina-2-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior,

(90,6 g, 0,492 mol) se le añadió trietilamina (206 ml, 1,476 mol) y Boc₂O (117 g, 0,542 mol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título.

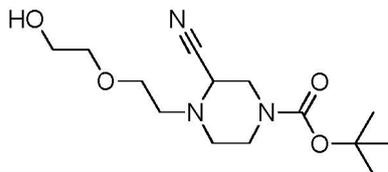
¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 4.06-3.91 (m, 3H), 3.28-2.83 (m, 4H), 1.47 (s, 9H).

5

Paso C

terc-Butil 3-ciano-4-(2-(2-hidroxi)etoxi)etil)piperazina-1-carboxilato

10



15

Se trató una solución de terc-butilo 3-cianopiperazina-1-carboxilato, preparada como se describe en el paso anterior (10 g, 0,047 mol) y 2-(2-hidroxi)acetaldehído (14,8 g) (ver: Bodin, A., Contact Dermatitis, 2001, 44:207) en diclorometano con ácido fórmico (12,7 g) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió cianoborohidruro sódico (7,2 g, 0,118 mol) en porciones. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas seguido por la adición de agua y extracción con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para proporcionar el producto.

20

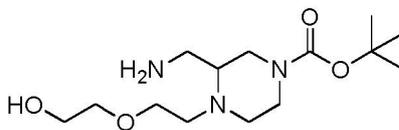
¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 4.15 (s, 1H), 3.69-3.63 (m, 4H), 3.58 (d, J=4.4 Hz, 2H), 3.47-3.44 (m, 4H), 2.61 (d, J=5.2 Hz, 2H), 2.51-2.48 (m, 4H), 1.43 (s, 9H).

25

Paso D

terc-Butil3-(aminometil)-4-(2-(2-hidroxi)etoxi)etil)piperazina-1-carboxilato

30



35

A una solución de terc-butil 3-ciano-4-(2-(2-hidroxi)etoxi)etil)piperazina-1-carboxilato, preparada como se describe en el paso anterior (9,9 g, 33,1 mmol) en metanol (20 ml) se le añadió Ni Raney (15 g). La solución de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo atmósfera de hidrógeno (50 psi). La mezcla se filtró y se concentró para proporcionar el producto, que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. ESI-MS (M+1): 304 calculado para C₁₄H₂₉N₃O₄ 303.

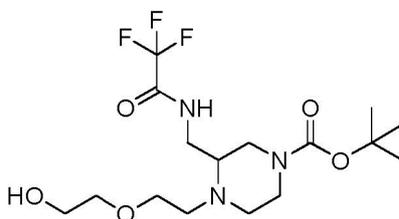
40

Paso E

terc-Butil 4-(2-(2-hidroxi)etoxi)etil)-3-((2,2,2-trifluoroacetamido)metil)piperazina-1-carboxilato

45

50



55

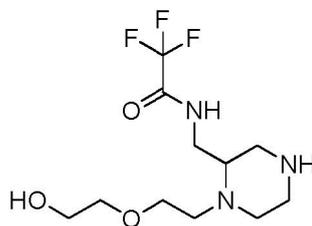
A una solución de terc-butil 3-(aminometil)-4-(2-(2-hidroxi)etoxi)etil)piperazina-1-carboxilato, preparada como se describe en el paso anterior (8,8 g) en diclorometano (100 ml) se le añadió trietilamina (8,8 g, 87,0 mmol) y anhídrido trifluoroacético (6,1 g, 29,0 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h, se diluyó con diclorometano y se lavó con agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para dar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.

60

ESI-MS (M+1): 400 calculado para C₁₆H₂₈F₃N₃O₅ 399.

65 Paso F

2,2,2-Trifluoro-N-((1-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-2-il)metil)acetamida



Se agitó una solución de terc-butil 4-(2-(2-hidroxietoxi)etil)-3-((2,2,2-trifluoroacetamido)metil)piperazina-1-carboxilato, preparada como se describe en el paso anterior, (8.6 g, en bruto) en cloruro de hidrógeno metanólico (20 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por concentración para proporcionar el compuesto del título que se usó sin purificación adicional.

ESI-MS (M + 1): 300 calculado para $C_{11}H_{20}F_3N_3O_3$ 299.

Paso G

Ácido 2-((2-nitrofenil)tio)benzoico



A una solución de ácido 2-mercapto-benzoico (30 g, 0,195 mol) en isopropanol (500 ml) a temperatura ambiente se le añadieron 1-fluoro-2-nitro-benceno (30,2 g, 0,214 mol), agua (100 ml) e hidróxido de potasio (31,1 g, 0,555 mol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se neutralizó con agua y se diluyó con acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 400 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con cloruro de sodio acuoso saturado (500 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron. El residuo bruto se purificó por cromatografía en columna flash sobre gel de sílice para dar el compuesto del título. ESI-MS (M+1): 276 calculado para $C_{13}H_9NO_4S$ 275. 1H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz): δ (ppm) 8.12-8.07 (m, 2H), 7.54-7.43 (m, 2H), 7.42-7.39 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 1H), 7.12-7.09 (m, 1H).

Paso H

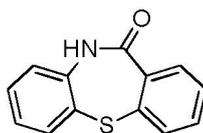
Ácido 2-((2-aminofenil)tio)benzoico



A una solución de ácido 2-((2-nitrofenil)tio)benzoico, preparada como se describe en el paso anterior, (43,3 g, 0,157 mol) en acetato de etilo (500 ml) se le añadió Pd/C (8 g). La solución de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche en atmósfera de gas de hidrógeno. La mezcla se filtró y se concentró para proporcionar el compuesto del título. ESI-MS (M+1): 246 calculado para $C_{13}H_{11}NO_2S$ 245. 1H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz): δ (ppm) 8.20-8.17 (m, 1H), 7.51-7.48 (m, 1H), 7.36-7.30 (m, 2H), 7.21-7.17 (m, 1H), 6.88-6.80 (m, 3H).

Paso I

Dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11(10H)-ona



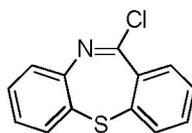
5

10 A una solución de ácido 2-((2-aminofenil)tio)benzoico, preparada como se describe en el paso anterior, (30 g, 0,122 mol) en diclorometano (300 ml) se le añadió EDCI (35,2 g, 0,183 mol), trietilamina (51 ml, 0,366 mol) y HOBT (24,7 g, 0,183 mol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, se lavó con HCl acuoso 1M, bicarbonato de sodio acuoso saturado, cloruro de sodio acuoso saturado, y se secó sobre MgSO₄. La solución se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título. ESI-MS (M+1): 228 calculado para C₁₃H₉NOS 227. ¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 7.70-7.67 (m, 1H), 7.58-7.52 (m, 2H), 7.50-7.42 (m, 2H), 7.39-7.35 (m, 1H), 7.24-7.22 (m, 1H), 7.17-7.13 (m, 1H).

15 Paso J

11-Chlorodibenzo[b,f][1,4]tiazepina

20



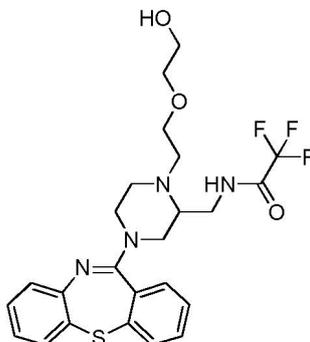
25 Se calentó a reflujo una solución de dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11(10H)-ona, preparada como se describe en el paso anterior (14,6 g, 64 mmol) en oxiclورو de fósforo (20 ml) durante 2 horas. La mezcla se concentró para proporcionar el producto bruto que se usó directamente sin purificación adicional. ESI-MS (M+1): 246 calculado para C₁₃H₈CLN 245.

30 Paso K

N-((4-(Dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-1-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-2-il)metil)-2,2,2-trifluoroacetamida

35

40



45

50 A una solución de 11-clorodibenzo[b,f][1,4]tiazepina, preparada como se describe en el paso anterior, (2 g, en bruto) en dioxano (20 ml) se añadió Pd₂(dba)₃ (327 mg), 0,357 mmol), BINAP (225 mg, 0,357 mmol), trietilamina (6 ml, 42,9 mmol) y 2,2,2-trifluoro-N-((1-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-2-il)metil)acetamida, preparada como se describe en el Paso F (2,4 g, en bruto). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante la noche bajo atmósfera de nitrógeno, se filtró a través de CELITE™ y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título. ESI-MS (M+1): 509 calculado para C₂₄H₂₇F₃N₄O₃S 508.

55 Paso L

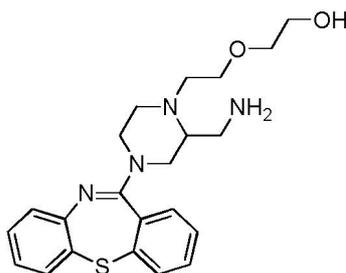
2-(2-(2-(Aminometil)-4-(dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)piperazin-1-il)etoxi)etanol

60

65

5

10



15

20

Se agitó una mezcla de N-((4-(dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-1-(2-(2-hidroxi)etoxi)etil)piperazin-2-il)metil)-2,2,2-trifluoroacetamida, preparada como se describe en el paso anterior, (2,0 g) y carbonato de potasio acuoso (5%) (15 ml) en metanol (20 ml) a temperatura ambiente durante 18 horas y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se lavaron con cloruro de sodio acuoso saturado, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, se evaporaron para dar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna, y seguido por prep-HPLC para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo. ESI-MS (M+1): 413 calculado para C₂₂H₂₈N₄O₂S 412. ¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 7.52-7.50 (m, 1H), 7.41-7.31 (m, 4H), 7.17-7.12 (m, 1H), 7.02-7.00 (m, 1H), 6.89-6.84 (m, 1H), 3.66-3.59 (m, 5H), 3.54-3.51 (m, 2H), 3.49-3.38 (m, 1H), 3.19-3.12 (m, 1H), 3.03-2.88 (m, 2H), 2.79-2.53 (m, 5H).

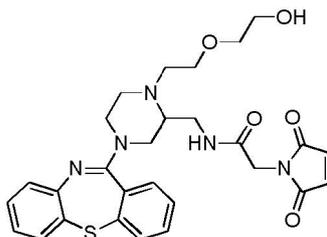
EJEMPLO 2

25

N-((4-(Dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-1-(2-(2-hidroxi)etoxi)etil)piperazin-2-il)metil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida

30

35



40

45

A una solución de 2-(2-(2-(aminometil)-4-(dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)piperazin-1-il)etoxi)etanol, preparado como se describe en el Ejemplo 1, (7,8 mg, 19,0 μmoles) en 410 μl de DMF y 8,9 μl de tributilamina se añadieron 480 μl de una solución de DMF de éster de N-(α-maleimidoacetoxi) succinimida (AMAS, 10 mg/ml, 4,8 mg, 19,0 μmoles). Se permitió que la solución resultante agitase durante 60 minutos a 20° C, luego se usó como tal en la reacción de conjugación con proteína activada con tiol.

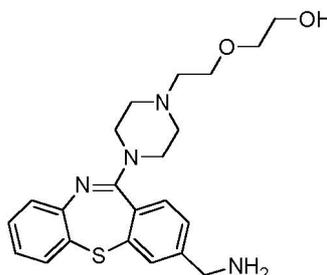
EJEMPLO 3

45

2-{2-[4-(3-Aminometil-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-piperazin-1-il]-etoxi}-etanol

50

55



Paso A

60

Ácido 11-oxo-10,11-dihidrodibenzo[b,f][1,4]tiazepina-3-carboxílico

65

5



10

Se calentó una mezcla de 2-amino-benzenotiol (1,34 ml, 12,5 mmol), ácido 2-bromo-tereftálico (1154 g, 613 mmol), óxido cuproso (0,50 g, 3,5 mmol), quinolina (6,3 ml) y piridina (0,63 ml) en un baño de aceite a 180° C bajo nitrógeno durante 20 horas, luego se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió ácido clorhídrico concentrado (20 ml) lentamente mientras se enfriaba en agua fría, con agitación. El precipitado resultante se filtró, se lavó con agua y se secó para dar el compuesto del título bruto (2 g). LC-MS: m/z 270 (M-1).

15

Paso B

Cloruro de 11-cloro-dibenzo[b,f][1,4]tiazepina-3-carbonilo

20



25

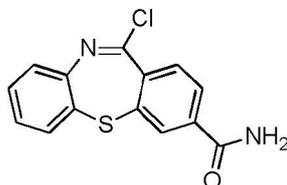
A una suspensión de ácido 11-oxo-10,11-dihidrodibenzo[b,f][1,4]tiazepina-3-carboxílico, preparado como se describe en el paso anterior, (0,41 g) en tolueno (6,5 ml) se añadió DMF (0,125 ml) y cloruro de tionilo (6,5 ml). La mezcla se calentó en un baño de aceite a 80° C bajo nitrógeno durante la noche. La solución resultante se concentró hasta la sequedad. El producto bruto se usó para el siguiente paso.

30

Paso C

Amida de ácido 11-cloro-dibenzo[b,f][1,4]tiazepina-3-carboxílico

35



40

45

Se trató una solución de cloruro de 11-cloro-dibenzo[b,f][1,4]tiazepina-3-carbonilo, preparada como se describe en el paso anterior, (aproximadamente 1,5 mmol) en diclorometano (10 ml) con una solución 1,4-dioxano de amoníaco (0,5 M, 9 ml) bajo baño de hielo. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y la reacción se neutralizó con agua (10 ml). El precipitado resultante se filtró, se lavó con agua y diclorometano, y se secó. La capa orgánica del filtrado se lavó con una solución de bicarbonato sódico acuosa saturada y se concentró para obtener un producto blanquecino adicional, que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. LC-MS: m/z 289 (M+1). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 8.19 (br, 1H), 8.00-7.96 (m, 2H), 7.90 (d, 1H), 7.64 (br, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.31 (m, 2H).

50

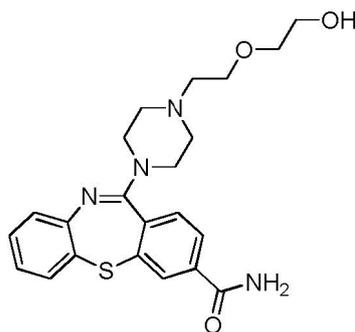
Paso D

Amida de ácido 11-{4-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etil]-piperazin-1-il}-dibenzo[b,f][1,4]tiazepina-3-carboxílico

55

60

65

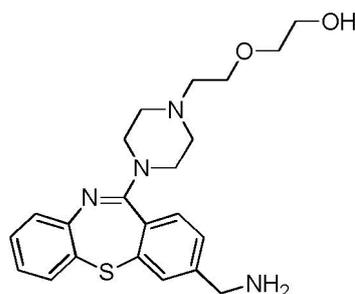


32

A una solución de amida de ácido 11-cloro-dibenzo[b,f][1,4]tiazepina-3-carboxílico, preparada como se describe en el paso anterior, (0,40 g) en DMF (1,5 ml) y tolueno (1,5 ml) se añadió 2-(2-piperazin-1-il-etoxi)-etanol (0,50 g, 2,9 mmol). La solución se calentó en un baño de aceite a 110° C bajo nitrógeno durante 5 horas, se concentró y se purificó (gel de sílice, metanol-diclorometano al 2-5% que contenía eluyente de amoníaco) para dar el compuesto del título como un sólido blanquecino. LC-MS: m/z 427 (M + 1).

Paso E

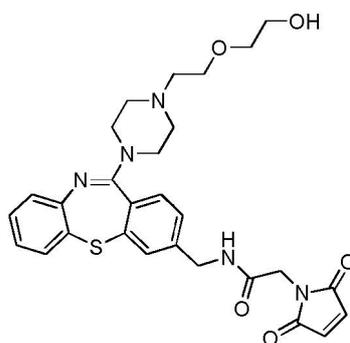
2-{2-[4-(3-Aminometil-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-piperazin-1-il]-etoxi}-etanol



A una solución de 2-{2-[4-(3-aminometil-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-piperazin-1-il]-etoxi}-etanol, preparado como se describe en el paso anterior, (0,24 g, 0,56 mmol) en THF (15 ml) se añadió una solución THF 1 M de hidruro de litio y aluminio (6 ml, 6 mmol). La suspensión blanca se calentó en un baño de aceite a 70° C bajo nitrógeno durante 2 horas. La suspensión de la reacción se neutralizó con la adición lenta de solución de sulfato de sodio acuosa saturada en un baño de hielo. La fase de la solución se separó y se extrajo el sólido en THF (5 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron (gel de sílice, metanol-diclorometano al 2-5% que contenía eluyente de amoníaco) para dar el compuesto del título como un sólido blanquecino. LC-MS: m/z 413 (M+1). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7.47 (s, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.26 (m, 2H, superpuesto con el solvente), 7.17 (m, 1H), 7.06 (m, 1H), 6.88 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.76-3.46 (m, 11H, contenía protones intercambiables), 2.66-2.57 (m, 8H).

EJEMPLO 4

2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((11-(4-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-1-il)dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-3-il)metil)acetamida



A una solución de 2-{2-[4-(3-aminometil-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-piperazin-1-il]-etoxi}-etanol, preparado como se describe en el Ejemplo 3, (5,6 mg, 13,6 μmoles) en 295 μl de DMF y 6,4 μl de tributilamina se añadieron 340 μl de una solución en DMF de éster de N-(α-maleimidoacetoxi)succinimida (AMAS, 10 mg/ml, 3,4 mg, 13,6 μmoles). Se permitió que la solución resultante agitase durante 60 minutos a 20° C, luego se usó como tal en la reacción de conjugación con proteína activada con tiol.

EJEMPLO 5

Conjugado de N-((4-(dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-1-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-2-il)metil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida-tiroglobulina bovina

Paso A

Reacción de Tiroglobulina Bovina (BTG) con SATA:

A 3,0 ml de una solución de tiroglobulina bovina (BTG, 20,0 mg, 0,03 μ moles) en tampón de fosfato 100 mM, pH 7.5, se añadieron 276,0 μ l de una solución DMF de N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA, 25 mg/ml, 6,9 mg, 30,0 μ moles). La solución resultante se incubó a 20° C durante 1 hora en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, EDTA 5 mM, a pH 6.0. A 6,0 ml de BTG-SATA (18,0 mg, 0,027 μ moles) se añadieron 600 μ l de hidroxilamina 2,5 M, EDTA 50 mM, pH 7.0. La solución resultante se incubó a 20° C durante 1 hora en un mezclador de rodillos.

Paso B

A una alícuota de la solución de BTG-SH, preparada como se describe en el paso anterior, (6,6 ml, 0,027 μ moles) se añadió una alícuota de la solución preparada en el Ejemplo 2 (898,9 μ l, 19,0 μ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,45 μ m, luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7.4.

EJEMPLO 6

Conjugado de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((11-(4-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-1-il)dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-3-il)metil)acetamida-tiroglobulina bovina

A una alícuota de la solución de BTG-SH, preparada como se describe en el Ejemplo 5 Paso A, (3,4 ml, 0,014 μ moles) se añadieron 641,4 μ l de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((11-(4-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-1-il)dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-3-il)metil)acetamida, preparada como se describe en el Ejemplo 4, (13,6 μ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7.4.

EJEMPLO 7

Conjugado de N-((4-(dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)-1-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-2-il)metil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida-hemocianina de lapa californiana

Paso A

Hemocianina de Lapa Californiana (KLH) reacción con SATA

A una solución de 3,18 ml de hemocianina de lapa californiana (KLH, 15,6 mg, 0,156 μ moles) en tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, a pH 7.4 se añadieron 72,1 μ l de una solución DMF de N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA, 25 mg/ml, 1,8 mg, 7,80 μ moles). La solución resultante se incubó a 20° C durante 1 hora en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, EDTA 5 mM, a pH 6.0. A 6,27 ml de la solución KLH-SATA resultante (13,3 mg, 0,133 μ moles) se añadieron 627 μ l de hidroxilamina 2,5 M, EDTA 50 mM, a pH 7.0. La solución resultante se incubó a 20° C durante 1 hora en un mezclador de rodillos. La reacción se usó como tal en la reacción de conjugación con hapteno activado con maleimida.

Paso B

A una alícuota de solución KLH-SH, preparada como se describe en el paso anterior, se añadieron (6,9 ml, 0,133 μ moles) una parte alícuota de la solución preparada en el Ejemplo 2 (624,3 μ l, 13,3 μ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,45 μ m y luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro sódico 0,46 M, a pH 7.4.

EJEMPLO 8

Conjugado de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((11-(4-(2-(2-hidroxietoxi)etil)piperazin-1-il)dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-3-il)metil)acetamida-hemocianina de lapa californiana

A una alícuota de la solución de KLH-SH, preparada como se describe en el Ejemplo 7, Paso A (3,2 ml, 0,061 μ moles) se añadió una alícuota de la solución preparada en el Ejemplo 4 (283,0 μ l, 6,10 μ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, a pH 7.4.

EJEMPLO 9

Inmunoensayos competitivos para Quetiapina e Inmunoensayo Competitivo Multiplex para Aripiprazol, Olanzapina, Quetiapina y Risperidona/Paliperidona

5 Tras de una serie de inmunizaciones con inmunógenos de quetiapina, se analizaron los sangrados de la cola de ratón para reactividad usando un ELISA. También se analizaron los sobrenadantes de hibridoma, y los datos de ELISA mostrados en las Tablas 8 y 9 a continuación muestran la reactividad de varios hibridomas (el compañero de fusión era células NSO). Tabla 8

10

Tabla 8

15

20

25

30

35

40

| Dilución | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------------|
| 400 | 79 | 89 | 90 | 95 | Comp N° 9 |
| 400 | | | | | |
| 1200 | | | | | |
| | | | | | |
| 3600 | | | | | |
| 3600 | | | | | |
| 10800 | | | | | |
| 10800 | | | | | |
| BI Sub | 1.5858 | 1.3168 | 1.4302 | 0.0533 | Comp N° 9 |
| | 1.5111 | 1.0627 | 1.2186 | 0.0427 | |
| | 0.5578 | 0.4213 | 0.598 | 0.0219 | |
| | 0.554 | 0.4447 | 0.5353 | 0.0233 | |
| | 0.1932 | 0.1582 | 0.1868 | 0.0154 | |
| | 0.171 | 0.2111 | 0.1838 | 0.0132 | |
| | 0.0736 | 0.0722 | 0.0733 | 0.0107 | |
| | 0.0884 | 0.0774 | 0.086 | 0.0107 | |

Tabla 9

45

50

55

60

| dilución | 4C12 | 1A4 | 4G12 | 1F6 |
|----------|-------------|------------|-------------|------------|
| 400 | 0.5467 | 0.2002 | 0.0144 | 0.1308 |
| 1200 | 0.1793 | 0.0619 | 0.01035 | 0.03905 |
| 3600 | 0.06655 | 0.026 | 0.00825 | 0.0192 |
| 10800 | 0.02755 | 0.0132 | 0.00765 | 0.01035 |
| 400 | 3.7296 | 0.24275 | 0.22585 | 0.00615 |
| 1200 | 2.4516 | 0.08695 | 0.0763 | 0.00685 |
| 3600 | 1.1575 | 0.0282 | 0.02875 | 0.00615 |
| 10800 | 0.4622 | 0.0147 | 0.0145 | 0.00645 |
| dilución | 5E9 | 2F2 | 3E2 | |

65

El sobrenadante se probó luego mediante ELISA de competición para determinar si las señales eran específicas para la quetiapina. Las Figs. 1 y 2 muestran los resultados de hibridomas representativos. Los datos muestran reactividad específica para la quetiapina.

La Fig. 3 muestra el formato de inmunoensayo competitivo usado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral en el que el anticuerpo de captura, un clon de la quetiapina, se depositó en un chip junto con un conjugado de detección que consistía de quetiapina conjugada con un fluoróforo. En este formato competitivo como se muestra en la Fig. 3, un bajo nivel de analito (quetiapina) da como resultado una señal alta, mientras que un nivel alto de analito (quetiapina) da como resultado una señal baja. La cantidad de quetiapina en la muestra puede calcularse a partir de la pérdida de fluorescencia en comparación con una muestra control sin fármaco presente. En la Fig. 4 se muestra una curva de respuesta a dosis típica generada con los subclones de quetiapina 89-3, 89-13 y 89-5.

La Fig. 5 muestra el diseño del chip de un dispositivo de ensayo de flujo lateral de acuerdo con una realización de la presente invención. El dispositivo incluye una zona o área para recibir la muestra, una zona conjugada (que contiene socio(s) de enlace competitivo marcado deseado) y una zona de reacción (se indican ocho áreas dentro de la zona de reacción, cada área puede contener un anticuerpo deseado separado)) La muestra fluye desde la zona de muestra a través de la zona conjugada y a la zona de reacción.

Las Figs. 6-9 muestran curvas de respuesta a dosis típicas para un control positivo de aripiprazol (muestra que contiene aripiprazol) generadas con el anticuerpo 5C7 depositado en la zona de reacción 2 y un compañero de enlace competitivo de aripiprazol marcado en la zona conjugada (Fig. 6), un control positivo de olanzapina (muestra que contiene olanzapina) generado con el anticuerpo 4G9-1 depositado en la zona de reacción 4 y un compañero de enlace competitivo marcado con olanzapina en la zona conjugada (Fig. 7), un control positivo de quetiapina (muestra que contiene quetiapina) generado con el anticuerpo 11 depositado en la zona de reacción 6 y un compañero de enlace competitivo marcado con quetiapina en la zona conjugada (Fig. 8), y un control positivo de risperidona (muestra que contiene risperidona) generado con el anticuerpo 5-9 depositado en la zona de reacción 8 y un compañero de enlace competitivo de risperidona marcado en la zona conjugada (Fig. 9) Los compañeros de enlace competitivo marcados en la zona conjugada compiten con los fármacos presentes en las muestras por el enlace con los anticuerpos. Se detecta la cantidad de marcador y es una indicación de la cantidad de fármaco presente en la muestra (la cantidad de señal siendo inversamente proporcional a la cantidad de fármaco en la muestra - ver Fig. 3).

Para confirmar que los conjugados de los compañeros de enlace competitivos marcados no enlazan con los anticuerpos depositados en las zonas de reacción, se realizaron controles negativos usando muestras que no contienen fármacos. Con referencia a la Tabla 10, una muestra que no contiene aripiprazol se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona conjugada (esta vez conteniendo olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada, pero no aripiprazol marcado) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2. La Tabla 10 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis y los conjugados de olanzapina, quetiapina y risperidona que se mueven por acción capilar a través de la zona de reacción no enlazan con el anticuerpo de aripiprazol.

Tabla 10

| Aripiprazol Clon-5C7 Modelo Matemático 1 (Ong/ml Conc.) | | | | | | |
|---|------------------|------------------|----------------|-----------------|-------------------|-------------|
| Ensayo-MM | Conj | Zona de Reacción | Posición Leída | Área Pico Media | Altura Pico Media | Fondo Medio |
| ARIP-MM1 | OLAN, QUET, RISP | ARIP | 2 | 0.77 | 1.56 | 3.99 |
| ARIP-MM1 | OLAN, QUET, RISP | | 4 | -0.02 | 0.06 | 4.14 |
| ARIP-MM1 | OLAN, QUET, RISP | | 6 | 0.09 | 0.10 | 4.29 |
| ARIP-MM1 | OLAN, QUET, RISP | | 8 | 0.13 | 0.12 | 4.61 |
| Otros Conjugados no enlazan con Aripiprazol | | | | | | |

Con referencia a la Tabla 11, una muestra que no contiene olanzapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona conjugada (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, quetiapina marcada y risperidona marcada, pero no olanzapina marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4. La Tabla 11 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis y los conjugados de aripiprazol, quetiapina y risperidona que se

mueven por acción capilar a través de la zona de reacción no enlazan con el anticuerpo de olanzapina.

Tabla 11

| OLAN-Clon 4G9-1-Modelo Matemático 1 (0ng/ml Conc.) | | | | | | |
|---|-----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| Ensayo- MM | Conj | Zona de Reacción | Posición Leída | Área Pico Media | Altura Pico Media | Fondo Medio |
| OLAN-MM1 | ARIP,QUET, RISP | | 2 | -0.03 | 0.05 | 4.38 |
| OLAN-MM1 | ARIP,QUET, RISP | OLAN | 4 | 0.74 | 1.10 | 4.56 |
| OLAN-MM1 | ARIP,QUET, RISP | | 6 | 0.06 | 0.09 | 4.79 |
| OLAN-MM1 | ARIP,QUET, RISP | | 8 | 0.11 | 0.13 | 5.17 |
| Otros Conjugados no enlazan con Olanzapina | | | | | | |

En referencia a la Tabla 12, una muestra que no contiene quetiapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona conjugada (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada y risperidona marcada, pero no quetiapina marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6. La Tabla 12 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis y los conjugados de aripiprazol, olanzapina y risperidona que se mueven por acción capilar a través de la zona de reacción no enlazan con el anticuerpo de quetiapina.

Tabla 12

| Quetiapina-Clon 11-Modelo Matemático 1 (0ng/ml Conc.) | | | | | | |
|--|-----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| Ensayo- MM | Conj | Zona de Reacción | Posición Leída | Área Pico Media | Altura Pico Media | Fondo Medio |
| QUET-MM1 | ARIP,OLAN, RISP | | 2 | -0.01 | 0.07 | 3.85 |
| QUET-MM1 | ARIP,OLAN, RISP | | 4 | 0.01 | 0.12 | 4.01 |
| QUET-MM1 | ARIP,OLAN, RISP | QUET | 6 | 0.03 | 0.08 | 4.24 |
| QUET-MM1 | ARIP,OLAN, RISP | | 8 | 0.04 | 0.07 | 4.56 |
| Otros Conjugados no enlazan con Quetiapina | | | | | | |

En referencia a la Tabla 13, una muestra que no contiene risperidona se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona conjugada (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada y quetiapina marcada, pero no risperidona marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene nuevamente anticuerpos de risperidona (5-9) en la zona de reacción 8. La Tabla 13 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis y los conjugados de aripiprazol, olanzapina y quetiapina que se mueven por acción capilar a través de la zona de reacción no enlazan con el anticuerpo de risperidona.

Tabla 13

| Risperidona-Clon 5-9-Modelo Matemático 1 (Ong/ml Conc.) | | | | | | |
|--|----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| Ensayo- MM | Conj | Zona de Reacción | Posición Leída | Área Pico Media | Altura Pico Media | Fondo Medio |
| RISP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET | | 2 | 0.02 | 0.11 | 7.43 |
| RISP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET | | 4 | 0.05 | 0.14 | 7.73 |
| RISP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET | | 6 | 0.20 | 0.19 | 8.11 |
| RISP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET | RISP | 8 | 1.97 | 3.23 | 8.85 |
| Otros Conjugados no enlazan con Risperidona | | | | | | |

Para confirmar que los conjugados de los compañeros de enlace competitivos marcados enlazan solamente con sus anticuerpos respectivos depositados en las zonas de reacción, se llevaron a cabo controles negativos adicionales usando nuevamente muestras que no contenían fármacos. En referencia a la Tabla 14, una muestra que no contiene aripiprazol se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona del conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y anticuerpo de risperidona (5-9) en reacción zona 8. La Tabla 14 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis excepto para el anticuerpo de aripiprazol 5C7 (en la zona de reacción 2).

Tabla 14

| Aripiprazol-Clon 5C7-Modelo Matemático 1 (Ong/ml Conc.) | | | | | | |
|--|---------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| Ensayo- MM | Conj | Zona de Reacción | Posición Leída | Área Pico Media | Altura Pico Media | Fondo Medio |
| ARIP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET,RISP | ARIP | 2 | 60.34 | 97.53 | 5.44 |
| ARIP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET,RISP | | 4 | 2.86 | 3.91 | 11.66 |
| ARIP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET,RISP | | 6 | 1.12 | 1.23 | 11.03 |
| ARIP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET,RISP | | 8 | 3.14 | 4.19 | 12.94 |
| Sólo enlaza la Zona de Reacción de Aripiprazol | | | | | | |

En referencia a la Tabla 15, una muestra que no contiene olanzapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona del conjugado (esta vez contiene olanzapina marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y anticuerpo de risperidona (5-9) en reacción zona 8. La Tabla 15 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis, excepto para el anticuerpo de olanzapina 4G9-1 (en la zona de reacción 4).

Tabla 15

| OLAN-Clon 4G9-1-Modelo Matemático 1 (Ong/ml Conc.) | | | | | | |
|---|----------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| Ensayo- MM | Conj | Zona de Reacción | Posición Leída | Área Pico Media | Altura Pico Media | Fondo Medio |
| OLAN-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 2 | 0.02 | 0.08 | 4.86 |
| OLAN-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | OLAN | 4 | 34.23 | 51.80 | 5.39 |
| OLAN-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 6 | 0.22 | 0.32 | 5.39 |
| OLAN-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 8 | 0.15 | 0.17 | 5.59 |
| Sólo enlaza la Zona de Reacción de Olanzapina | | | | | | |

En referencia a la Tabla 16, una muestra que no contiene quetiapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona del conjugado (esta vez conteniendo quetiapina marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y anticuerpo de risperidona (5-9) en reacción zona 8. La Tabla 16 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis, excepto para el anticuerpo de quetiapina 11 (en la zona de reacción 6).

Tabla 16

| Quetiapina-Clon 11-Modelo Matemático 1 (Ong/ml Conc.) | | | | | | |
|--|----------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|
| Ensayo- MM | Conj | Zona de Reacción | Posición Leída | Área Pico Media | Altura Pico Media | Fondo Medio |
| QUET-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 2 | 0.13 | 0.41 | 10.02 |
| QUET-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 4 | 0.08 | 0.23 | 10.47 |
| QUET-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | QUET | 6 | 140.35 | 181.33 | 7.91 |
| QUET-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 8 | 1.58 | 2.61 | 11.53 |
| Sólo enlaza la Zona de Reacción de Quetiapina | | | | | | |

En referencia a la Tabla 17, se deposita una muestra que no contiene risperidona en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona del conjugado (esta vez conteniendo risperidona marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y anticuerpo de risperidona (5-9) en reacción zona 8. La tabla 17 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis, excepto para el anticuerpo de risperidona 5-9 (en la zona de reacción 8).

Tabla 17

| Risperidona-Clon 5-9-Modelo Matemático 1 (Ong/ml Conc.) | | | | | | |
|---|----------------------|------------------|----------------|-----------------|-------------------|-------------|
| Ensayo- MM | Conj | Zona de Reacción | Posición Leída | Área Pico Media | Altura Pico Media | Fondo Medio |
| RISP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 2 | 1.03 | 1.51 | 9.07 |
| RISP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 4 | 0.65 | 0.91 | 9.60 |
| RISP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | | 6 | 2.61 | 6.39 | 10.48 |
| RISP-MM1 | ARIP,OLAN,QUET, RISP | RISP | 8 | 55.98 | 100.91 | 11.58 |
| Sólo enlaza la Zona de Reacción de Risperidona | | | | | | |

Los resultados mostrados con anterioridad confirman que los conjugados de los compañeros de enlace competitivos marcados enlazan sólo con sus respectivos anticuerpos en la zona de reacción.

Las Figs. 10-13 muestran curvas típicas de respuesta a dosis en las zonas de reacción de anticuerpos específicos, y prueban la concentración baja/alta de respuesta a dosis para cada ensayo específico en presencia de otros conjugados. En la Fig. 10, una muestra que contiene aripiprazol se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona del conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada, y risperidona marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2. Se generó una curva de respuesta a dosis típica como se muestra en la Fig. 10 solo para aripiprazol, y no para olanzapina, quetiapina o risperidona.

En la Fig. 11, una muestra que contiene olanzapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona del conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4. Se generó una curva de respuesta a dosis típica como se muestra en la Fig. 11 solo para olanzapina, y no para aripiprazol, quetiapina o risperidona.

En la Fig. 12, una muestra que contiene quetiapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona del conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6. Se generó una curva típica de respuesta a dosis como se muestra en la Fig. 12 solo para quetiapina, y no para aripiprazol, olanzapina o risperidona.

En la Fig. 13, una muestra que contiene risperidona se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona conjugada (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada, y risperidona marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo anticuerpo de risperidona (5-9) en la zona de reacción 8. Se generó una curva de respuesta a dosis típica como se muestra en la Fig. 13 solo para risperidona, y no para aripiprazol, olanzapina o quetiapina.

Las Figs. 14-17 muestran las curvas de respuesta a dosis típicas para cada ensayo en presencia de otros conjugados y anticuerpos. En la Fig. 14, una muestra que contiene aripiprazol se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona conjugada (conteniendo de nuevo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene nuevamente anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y anticuerpo de risperidona (5-9) en reacción zona 8. Se generó una curva de respuesta a dosis típica para aripiprazol, como se muestra en la Fig. 14. Cuando se depositó una muestra que contenía olanzapina en la zona de muestra de este chip, se generó una curva de respuesta a dosis típica para olanzapina como se muestra en la Fig. 15. Cuando se depositó una muestra que contenía quetiapina en la zona de muestra de este chip, se generó una curva de respuesta a dosis típica para la quetiapina, como se muestra en la Fig. 16. Cuando se depositó una muestra que contenía risperidona en la zona de muestra de este chip, se generó una curva de respuesta a dosis típica para risperidona como se muestra en la Fig. 17.

Las Figs. 18-21 muestran comparaciones de curvas de respuesta a dosis generadas como controles positivos (Figs. 6-9) con curvas de respuesta a dosis generadas en el formato múltiplex (Figs. 14-17) La comparación de aripiprazol se muestra en la Fig. 18; para olanzapina en la Fig. 19; para quetiapina en la Fig. 20; y para risperidona en la Fig. 21. Estas figuras muestran que las curvas de control positivo son similares a las curvas multiplex.

Estos datos muestran que un dispositivo de ensayo de flujo lateral de la presente invención puede usarse para detectar múltiples fármacos antipsicóticos usando una única muestra de un paciente en un dispositivo portátil de punto de atención.

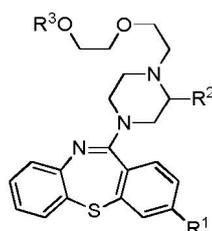
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Reivindicaciones

1. Un método para producir un anticuerpo que enlaza con quetiapina, el método comprendiendo:

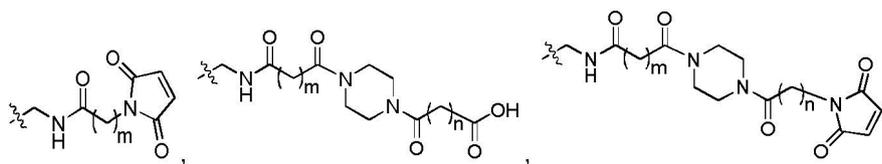
- 5 i. seleccionar un huésped no humano para la producción de anticuerpos; y
 ii. inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico, en donde el huésped produce un anticuerpo que enlaza con la quetiapina,

Formula I:

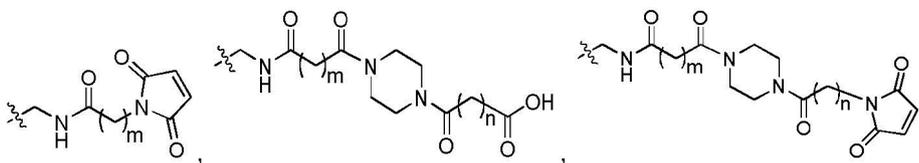


en donde:

R¹ es H,



CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
 R² es H,

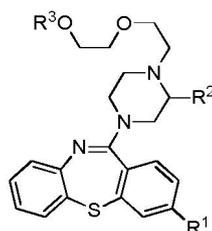


CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
 R³ es H; siempre que o R¹ o R² sean H, y además siempre que tanto R¹ como R² no sean H al mismo tiempo;
 m es 1, 2, 3, 4 ó 5; y
 n es 1, 2, 3, 4 ó 5.

2. Un método para producir una línea celular de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal que enlaza con quetiapina, el método comprendiendo:

- 50 i. seleccionar un huésped no humano para la producción de anticuerpos;
 ii. inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico;
 iii. fusionar una línea celular de dicho huésped inoculado con una célula que se divide continuamente para crear una célula fusionada capaz de producir un anticuerpo monoclonal que enlace con quetiapina; y
 iv. clonar la célula fusionada para obtener una línea celular de hibridoma,

Formula I:

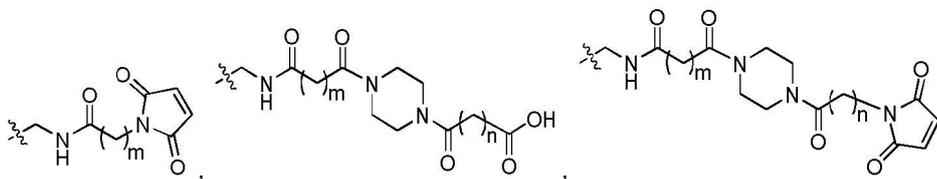


en donde:

R¹ es H,

5

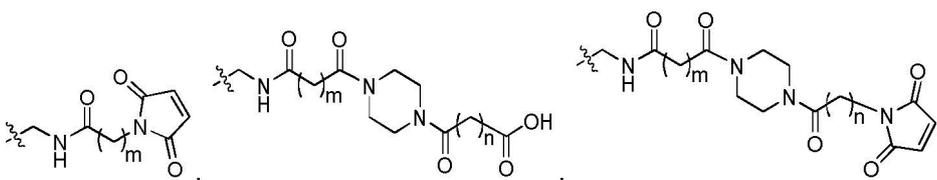
10



CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
R² es H,

15

20



CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;

R³ es H; siempre que o R¹ o R² sean H, y además siempre que tanto R¹ como R² no sean H al mismo tiempo;

m es 1, 2, 3, 4 ó 5; y

n es 1, 2, 3, 4 ó 5.

25

30

3. Un método para detectar quetiapina en una muestra, el método comprendiendo:

- i. poner en contacto una muestra con el anticuerpo producido en la reivindicación 1 marcado con un marcador detectable, en donde el anticuerpo marcado y la quetiapina presente en la muestra forman un complejo marcado; y
- ii. detectar el complejo marcado para detectar quetiapina en la muestra.

35

4. Un método de inmunoensayo competitivo para detectar quetiapina en una muestra, el método comprendiendo:

- i. poner en contacto una muestra con el anticuerpo producido en la reivindicación 1, y con quetiapina o un compañero de enlace competitivo de quetiapina, en donde uno de los anticuerpos y la quetiapina o el compañero de enlace competitivo de la misma está marcado con un marcador detectable, y en donde la quetiapina de la muestra compete con la quetiapina o compañero de enlace competitivo de la misma para enlazar con el anticuerpo; y
- ii. detectar el marcador para detectar la quetiapina de la muestra.

40

45

5. El método de la reivindicación 4 en donde:

- i. la quetiapina o el compañero de enlace competitivo de la misma está marcado con el marcador detectable;
- ii. el anticuerpo está marcado con un marcador detectable; o
- iii. el inmunoensayo se realiza en un dispositivo de ensayo de flujo lateral y la muestra se aplica al dispositivo.

50

6. El método de la reivindicación 3 ó 4:

- i. que comprende además detectar la presencia de uno o más analitos además de la quetiapina;
- ii. en donde la detección de quetiapina es una indicación del cumplimiento del paciente con la terapia de quetiapina prescrita;
- iii. en donde la detección de quetiapina se usa para determinar si un paciente debería convertirse de un régimen de quetiapina oral a un régimen antipsicótico inyectable;
- iv. en donde la detección de quetiapina se usa para determinar si el nivel de dosis o el intervalo de dosificación de quetiapina oral o inyectable debe aumentarse o disminuirse para asegurar la consecución o el mantenimiento de niveles de fármaco eficaces o seguros;
- v. en donde la detección de quetiapina es una ayuda en el inicio de la terapia con quetiapina proporcionando evidencia de la consecución de niveles mínimos de pK;
- vi. en donde la detección de quetiapina se usa para determinar la bioequivalencia de la quetiapina en formulaciones múltiples o de múltiples fuentes;
- vii. en donde la detección de quetiapina se usa para evaluar el impacto de la polifarmacia y las interacciones

55

60

65

fármaco-fármaco potenciales; o

viii. en donde la detección de quetiapina es una indicación de que un paciente debe ser excluido de o incluido en un ensayo clínico y es una ayuda en la monitorización posterior del cumplimiento de los requisitos de medicación del ensayo clínico.

5

7. El método de la reivindicación 6.i. en donde el uno o más analitos son fármacos antipsicóticos distintos de la quetiapina.

10

8. El método de la reivindicación 7, en donde los fármacos antipsicóticos distintos de la quetiapina se seleccionan del grupo que consiste de: risperidona, paliperidona, aripiprazol, olanzapina y metabolitos de los mismos.

9. Un kit de ensayo que comprende el anticuerpo producido en la reivindicación 1.

15

10. Un dispositivo de ensayo que comprende el anticuerpo producido en la reivindicación 1.

11. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 10 en donde el dispositivo es un dispositivo de ensayo de flujo lateral.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

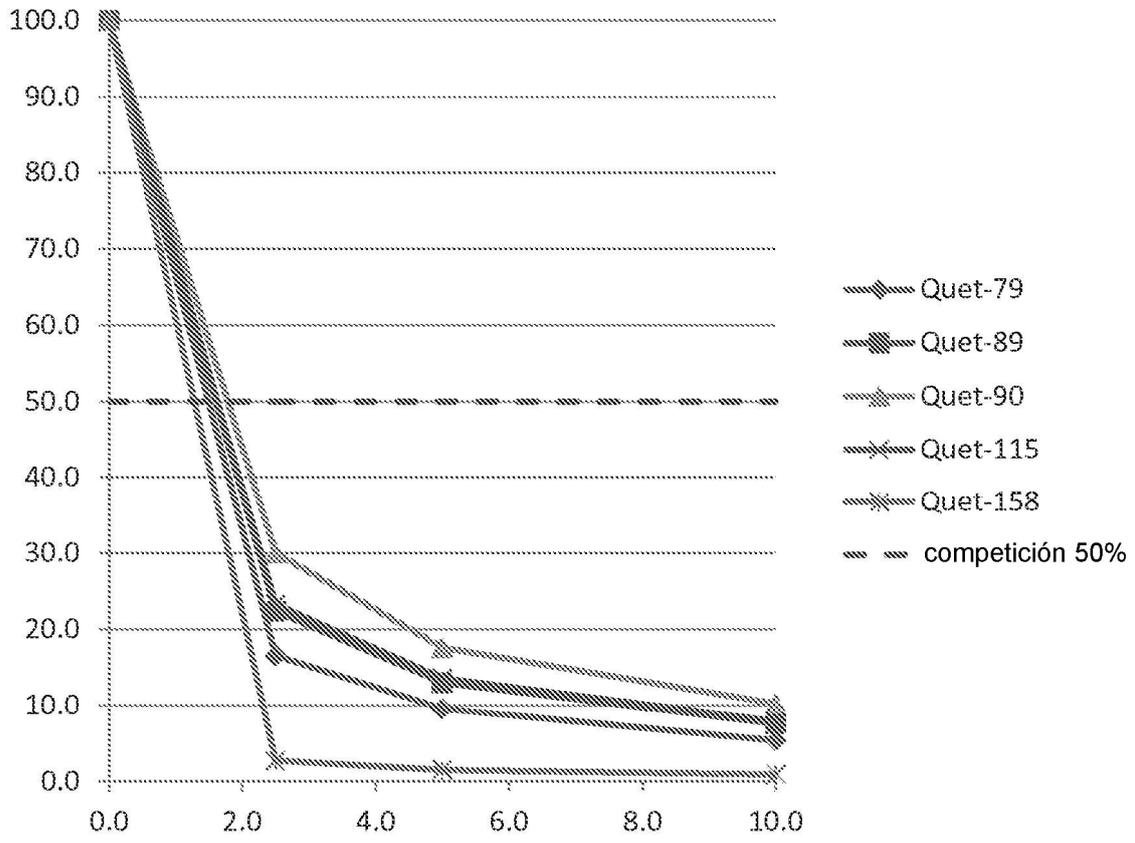


Fig. 2

Competición de clones de Ratón CTI 13.2

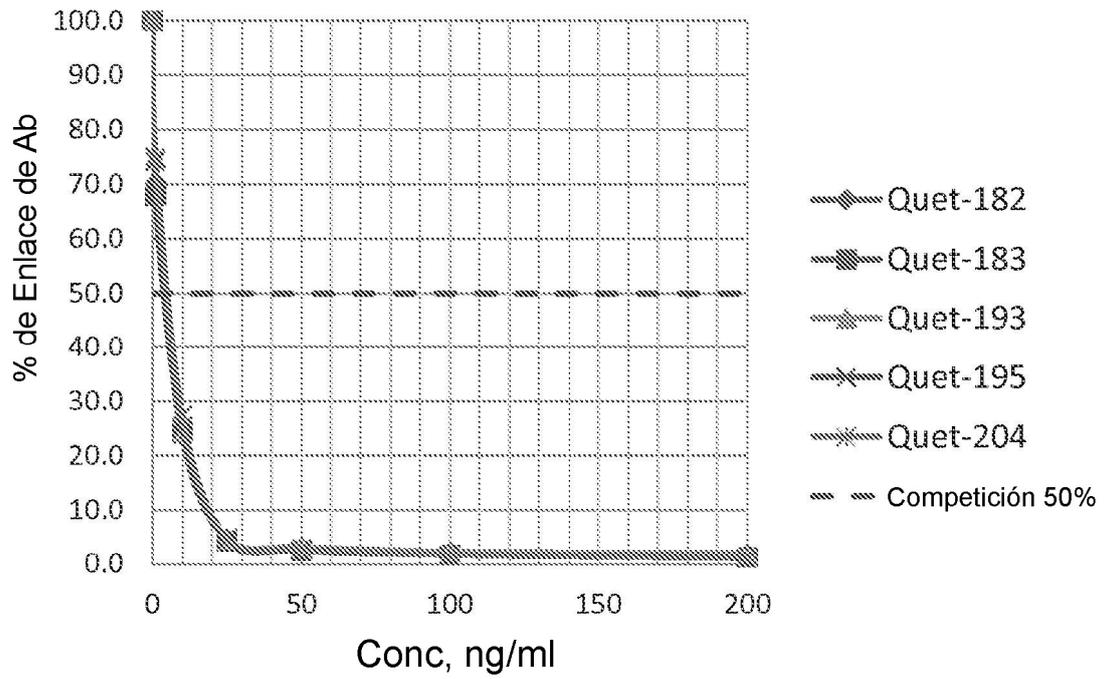


Fig. 3

Formatos Competitivos: Ab Abajo

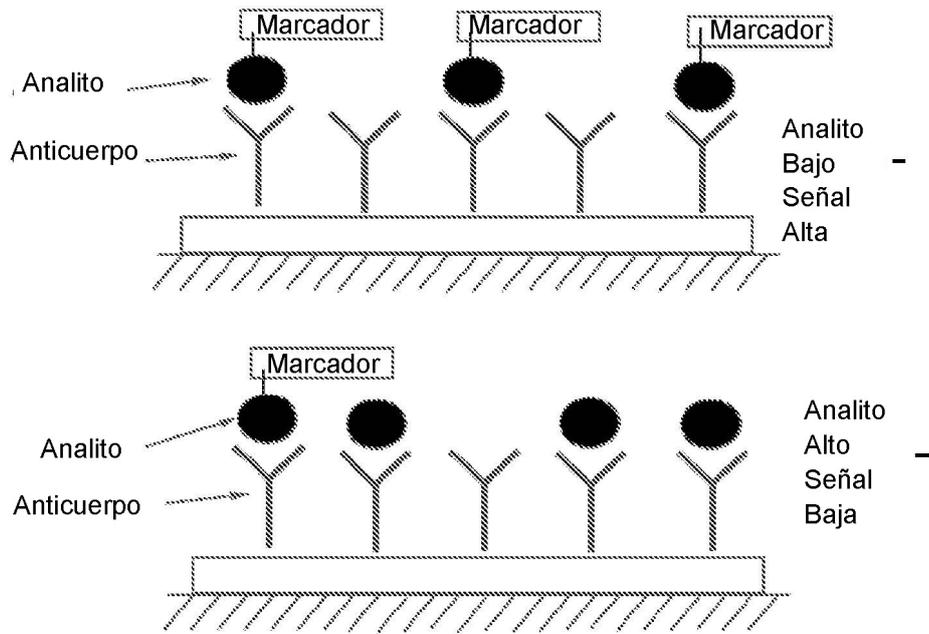


Fig. 4

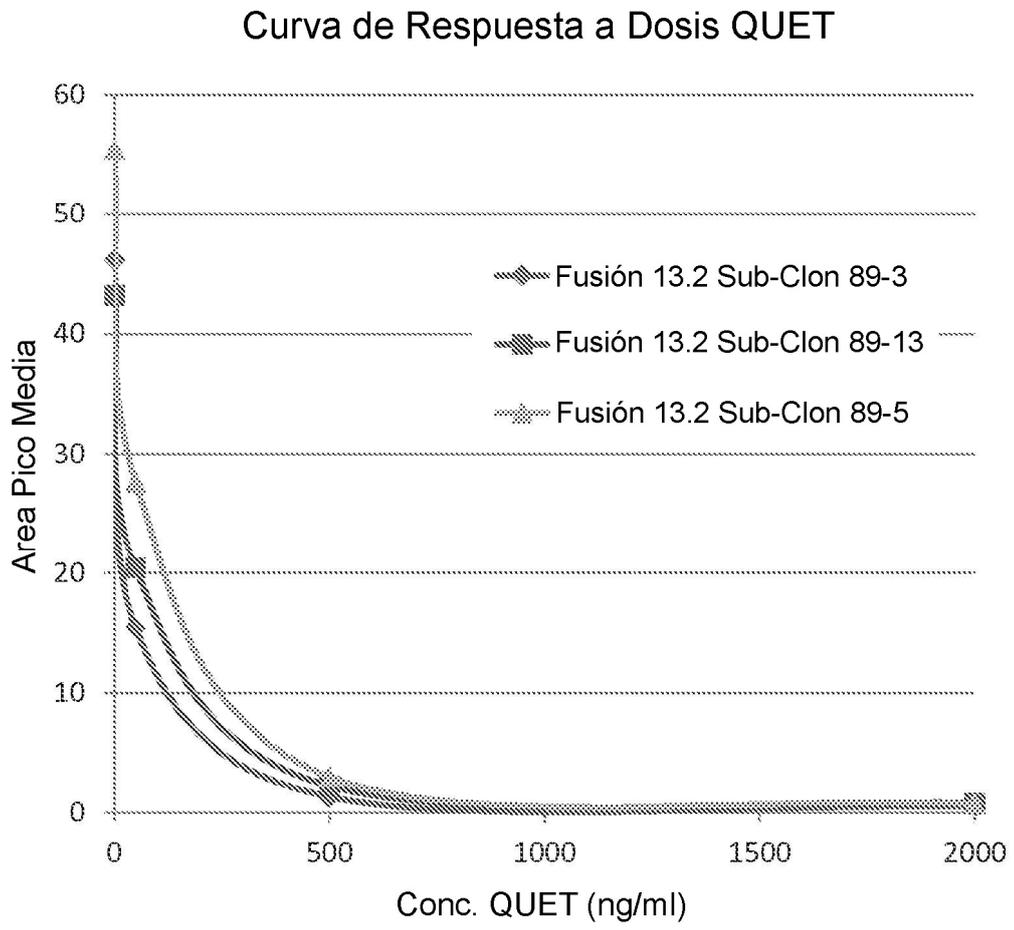


Fig. 5

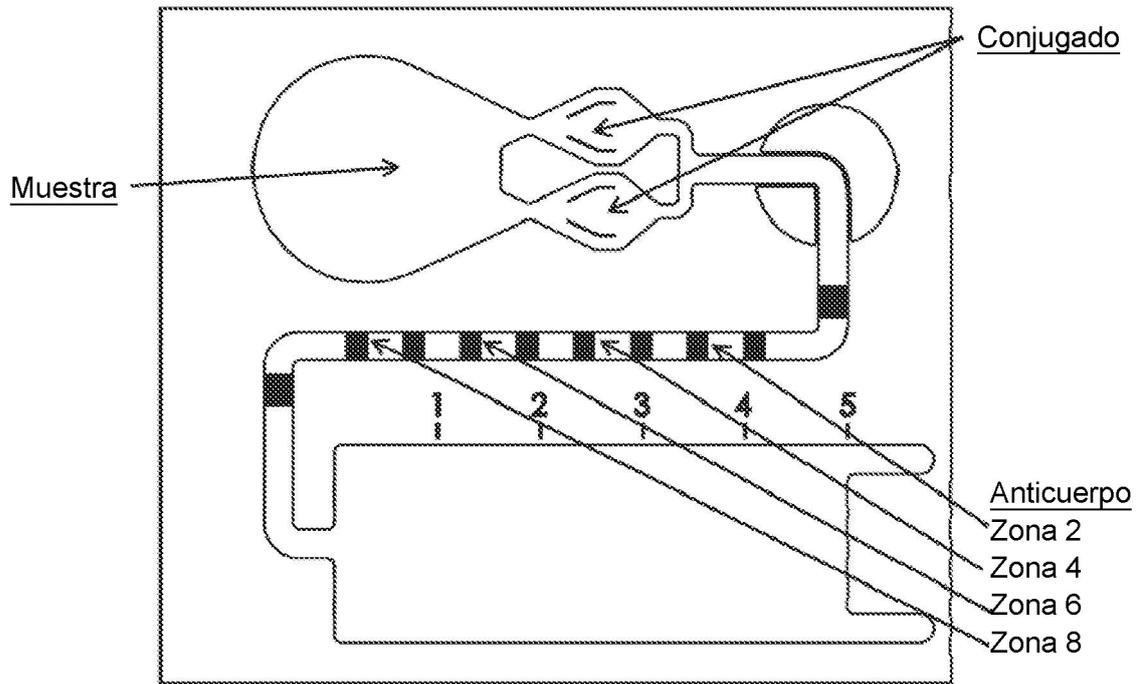


Fig. 6

Area Pico Media ARIP frente a Conc.
de CLon 5C7

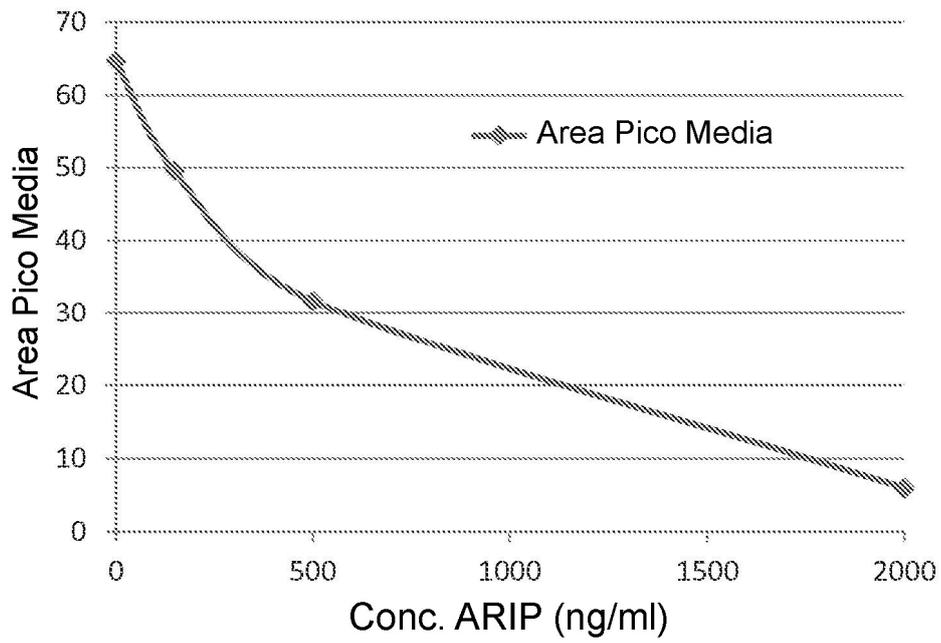


Fig. 7

Area Pico Media OLAN frente a Conc.
Clon 4G9-1

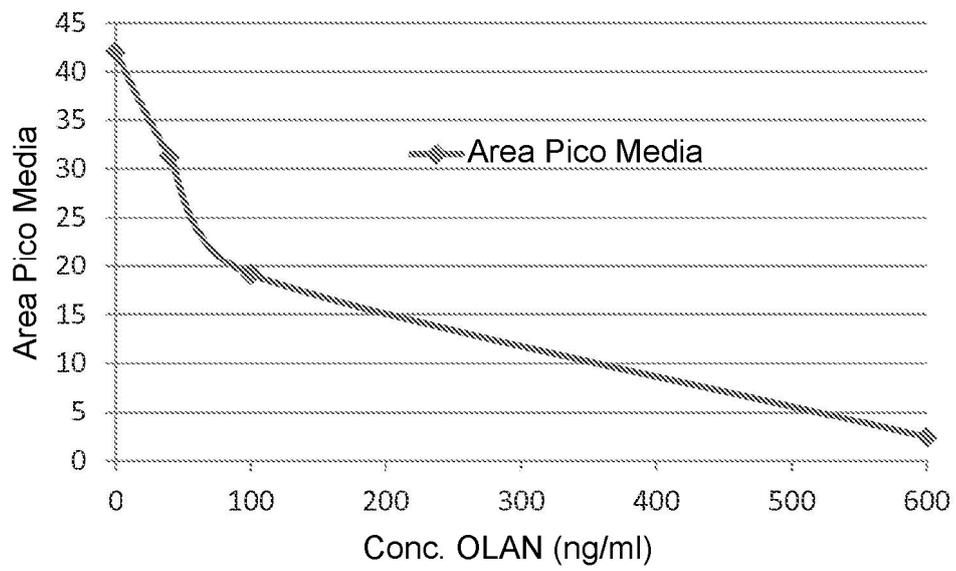


Fig. 8

Area Pico Media QUET frente a Conc.
Clon 11

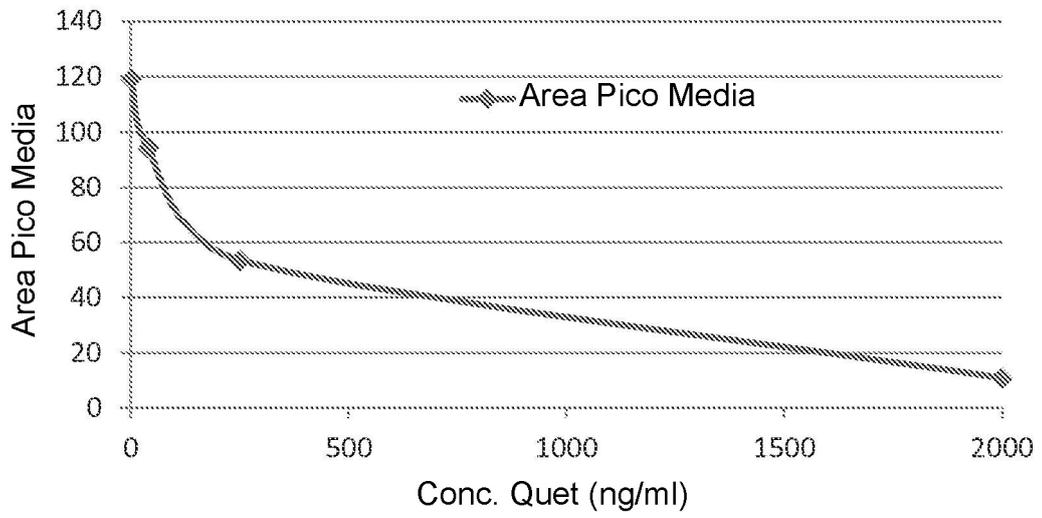


Fig. 9

Area Pico Media RISP frente a Conc.
Clon 5-9

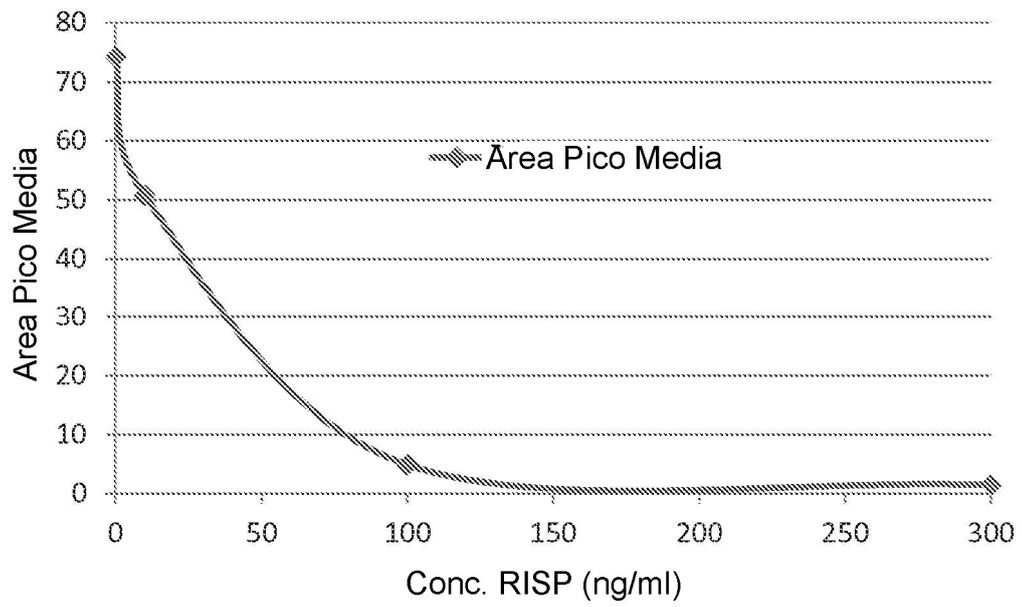
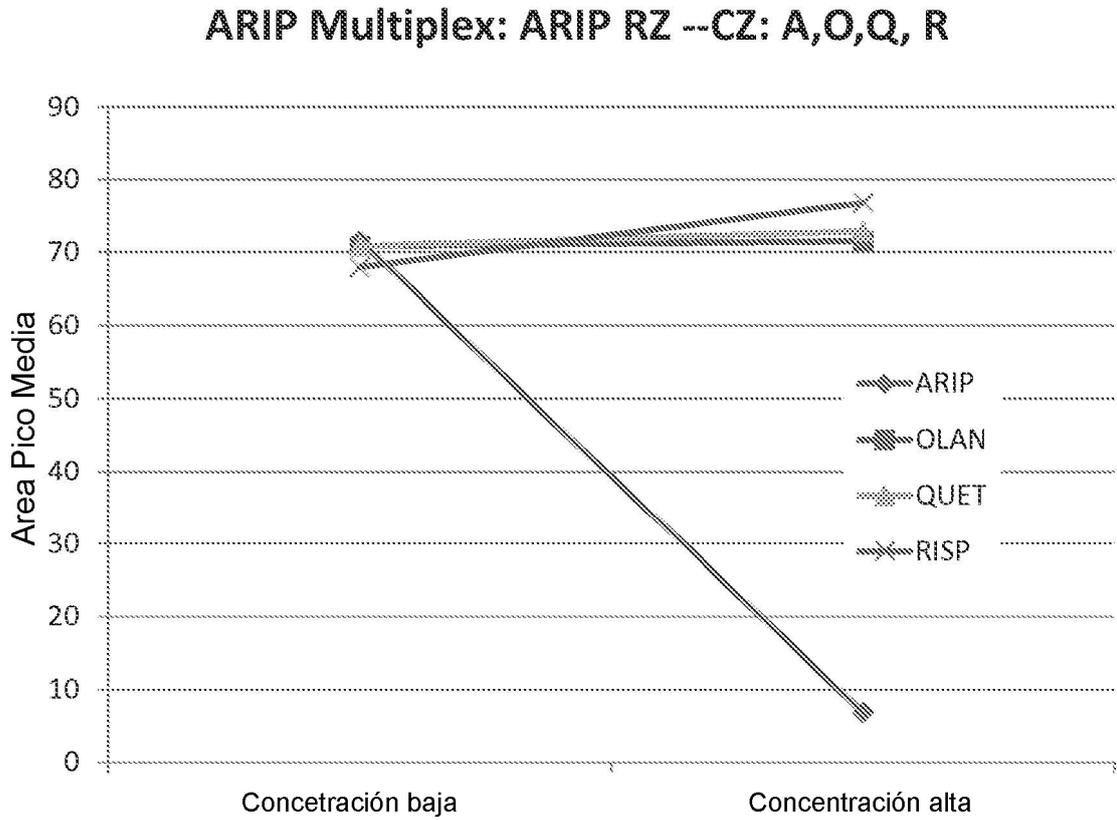


Fig. 10



Modelo Matemático de Fluidos Extremo Bajo y Alto Cada Ensayo

Fig. 11

OLAN Multiplex: OLAN RZ--CZ: A,O,Q,R

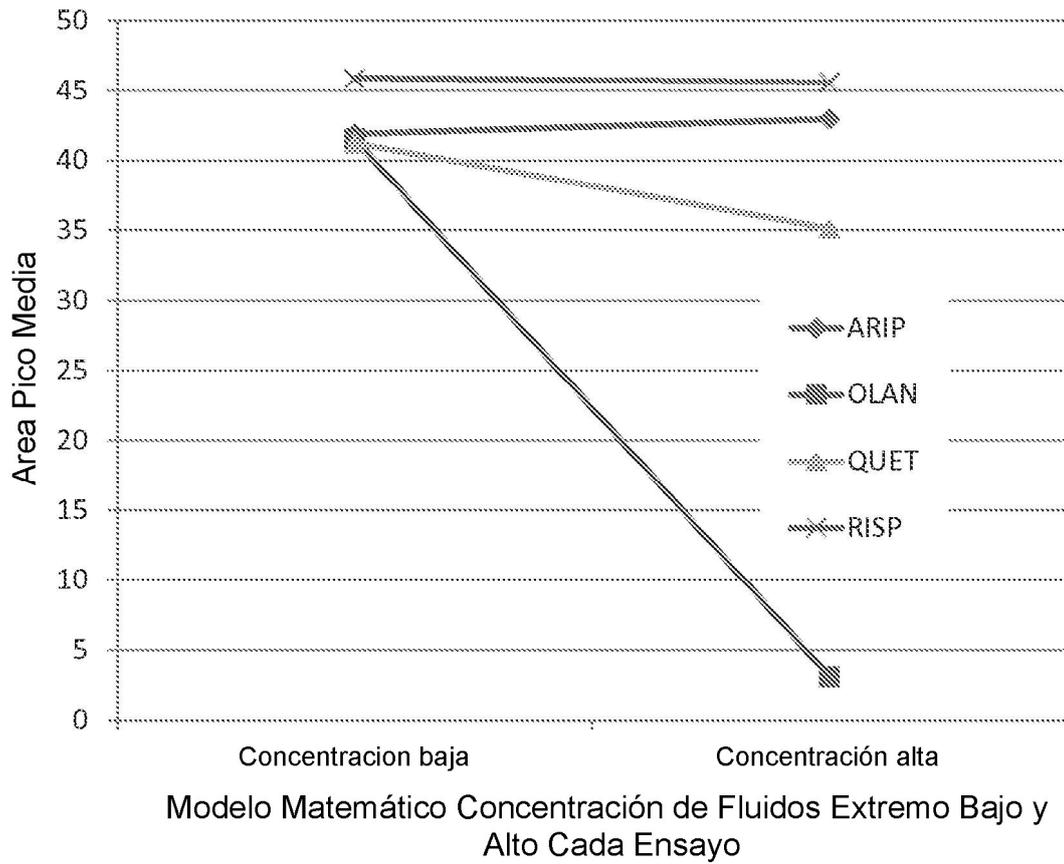
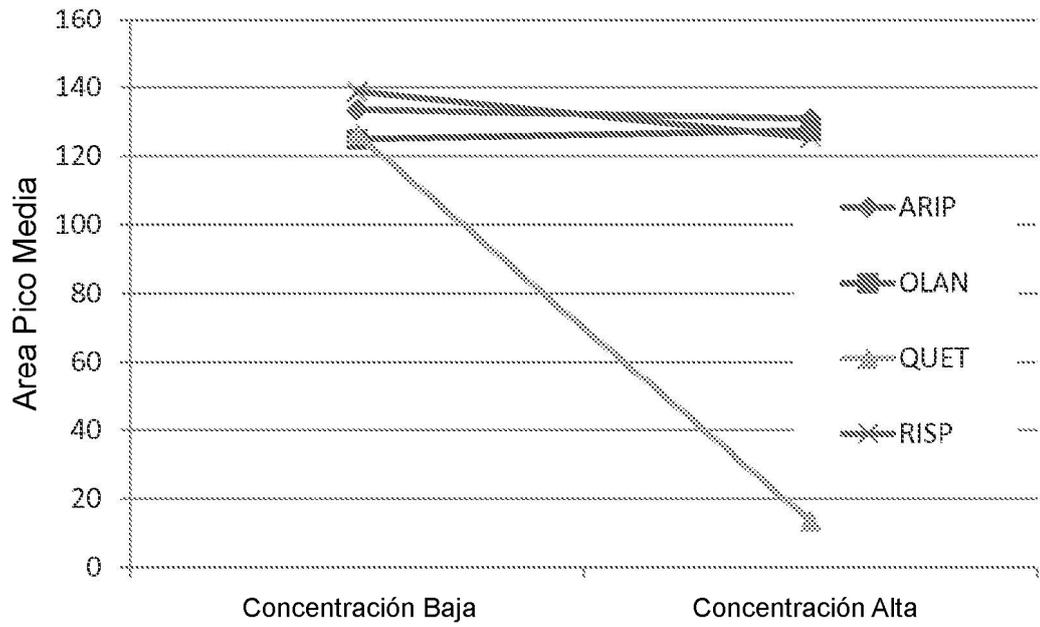


Fig. 12

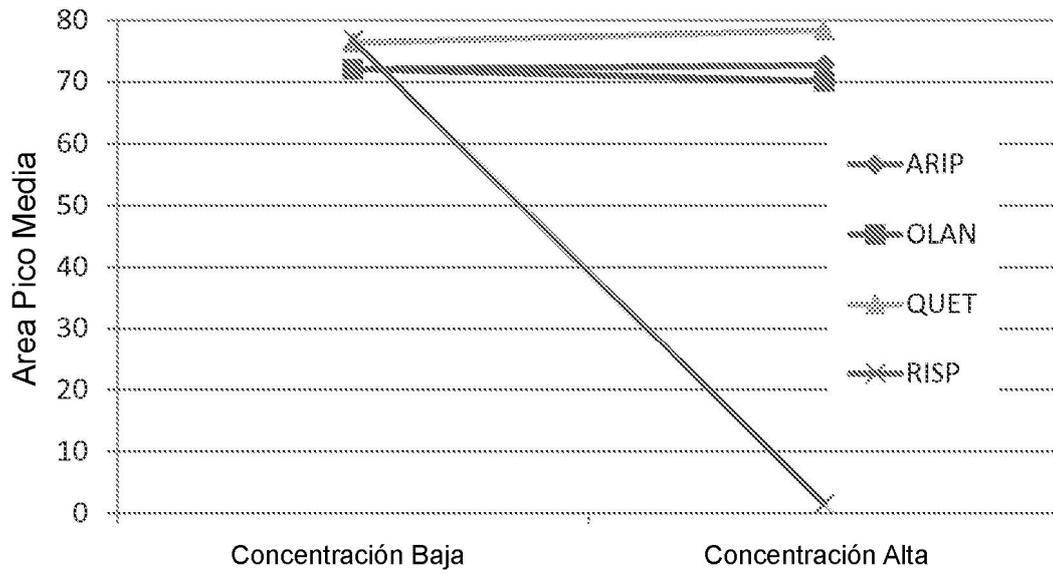
QUET Multiplex: QUET RZ--CZ: A,O,Q,R



Modelo Matemático Concentración de Fluidos Extremo Bajo y Alto Cada Ensayo

Fig. 13

RISP Multiplex: RISP RZ--CZ: A,O,Q,R



Modelo Matemático Concentración de FLuidos Extremo Bajo a Alto Cada Ensayo

Fig. 14

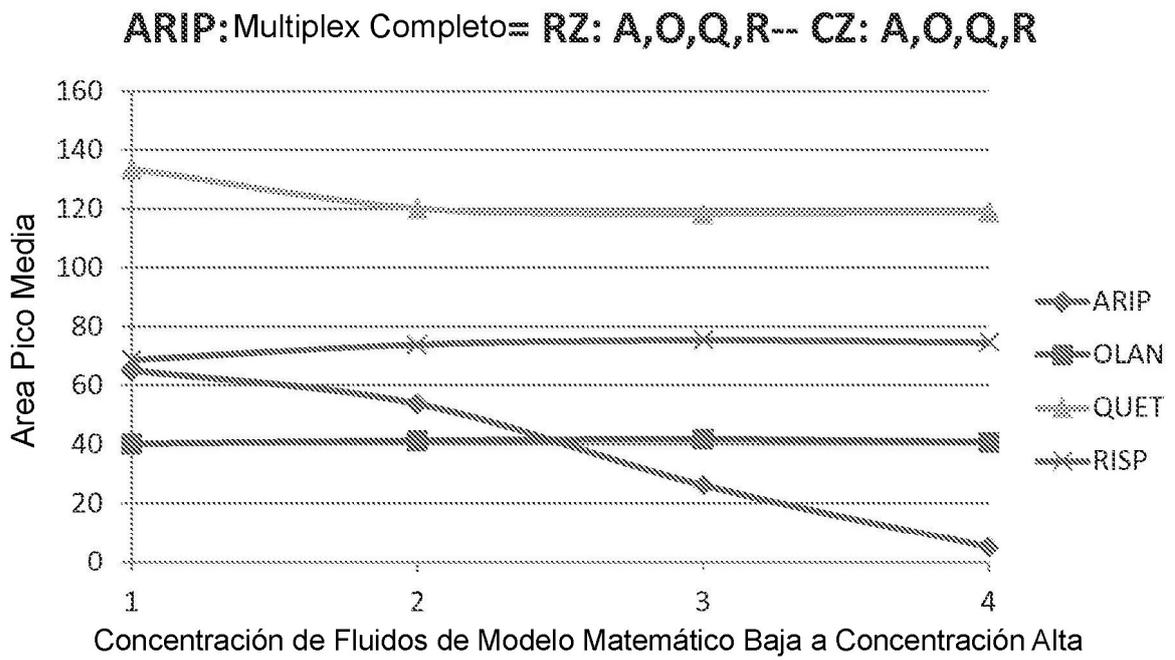


Fig. 15

**OLAN: Multiplex Completo = RZ: A,O,Q,R--CZ:
A,O,Q,R**

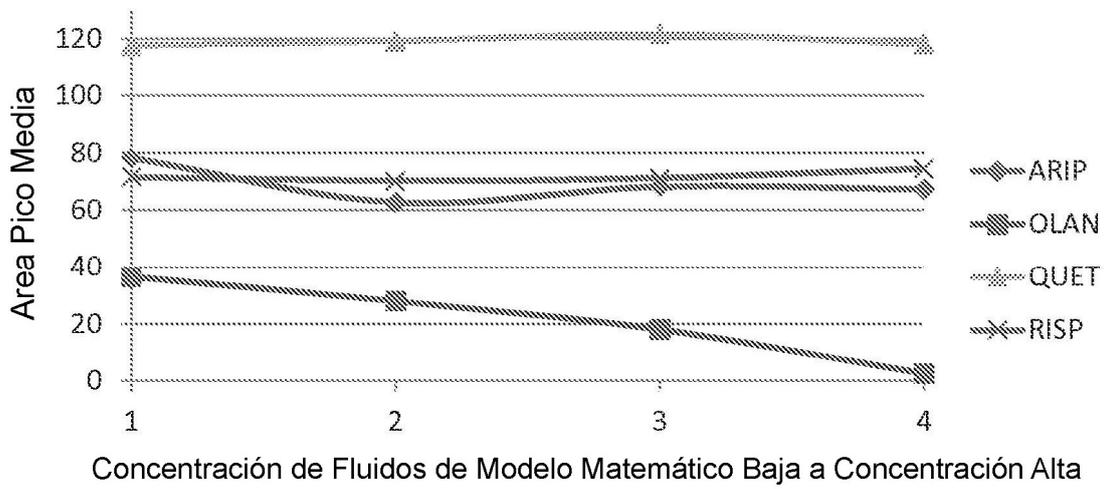


Fig. 16

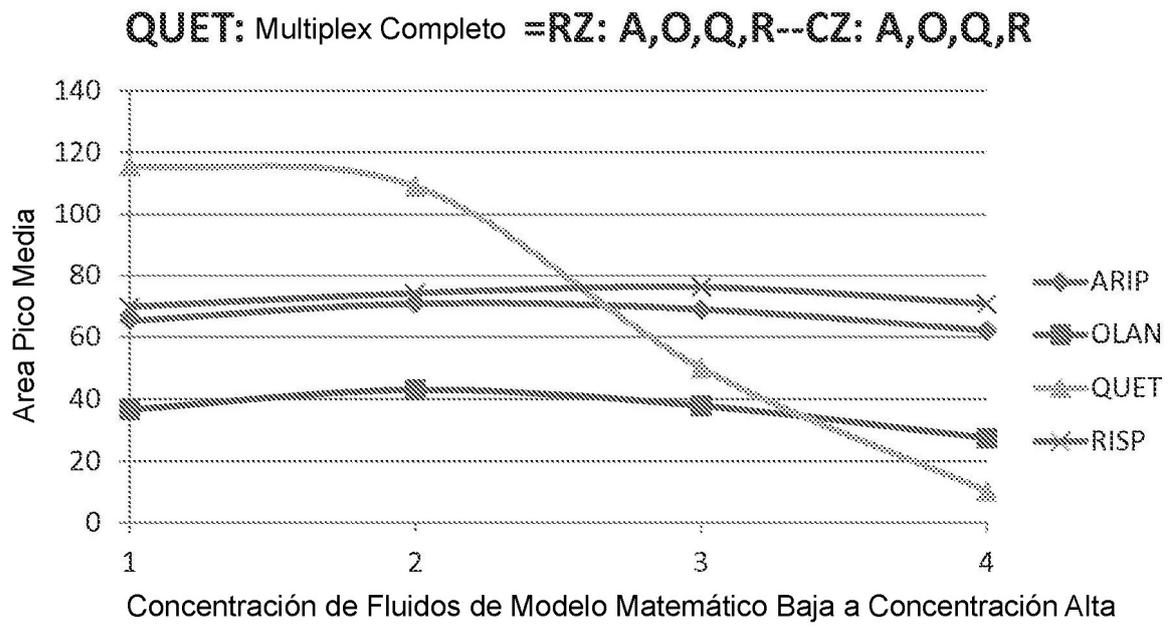


Fig. 17

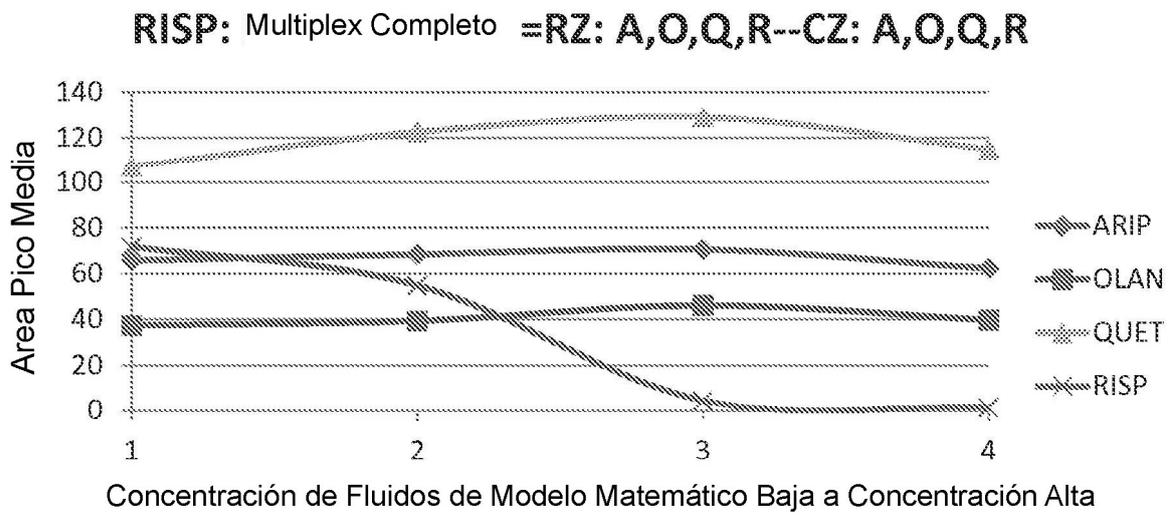


Fig. 18

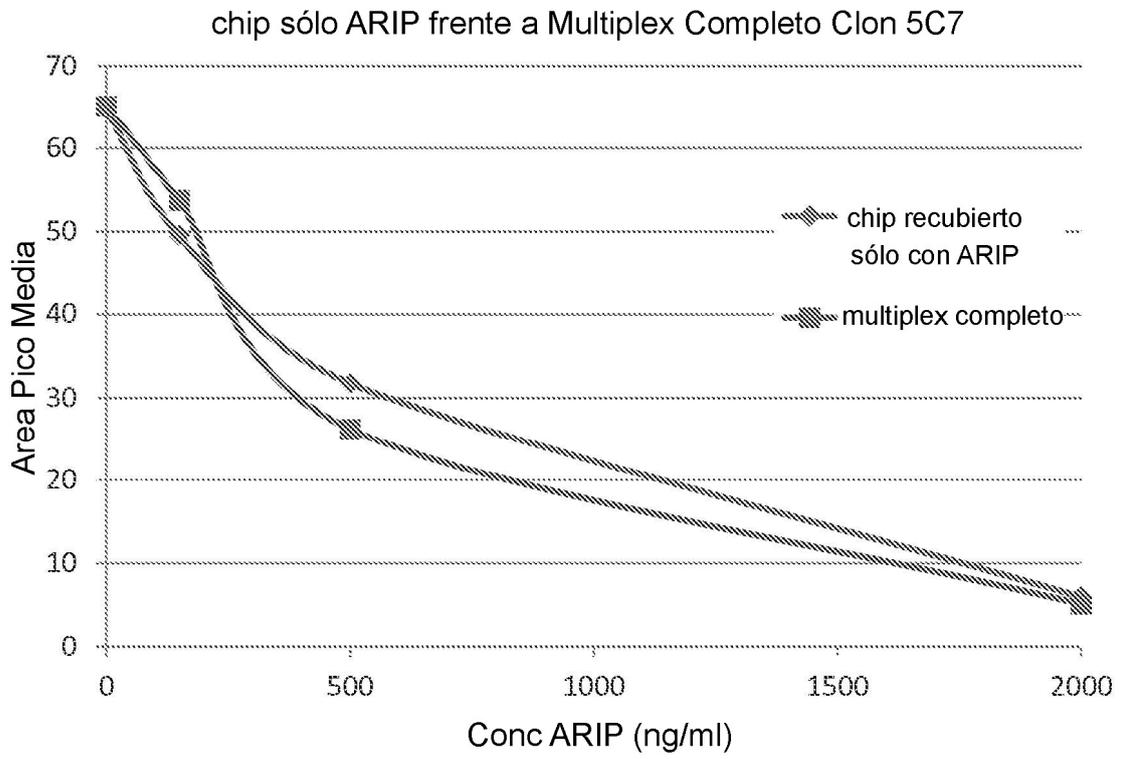


Fig. 19

chip sólo OLAN frente a Multiplex Completo 4G9-1

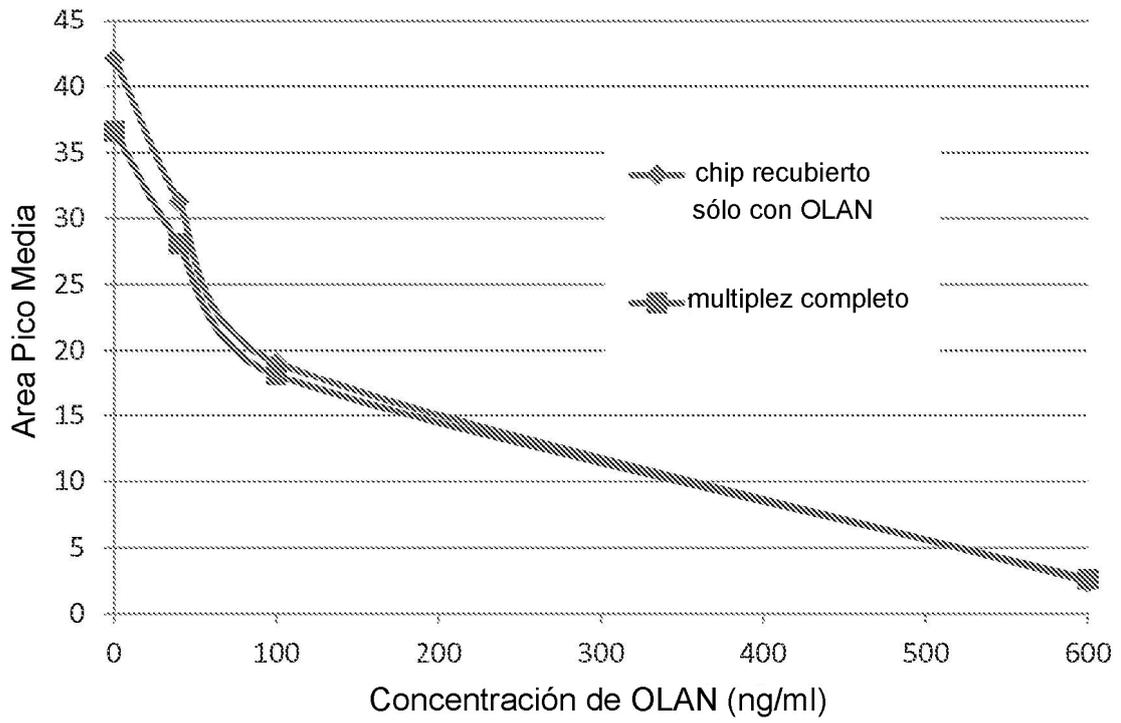


Fig. 20

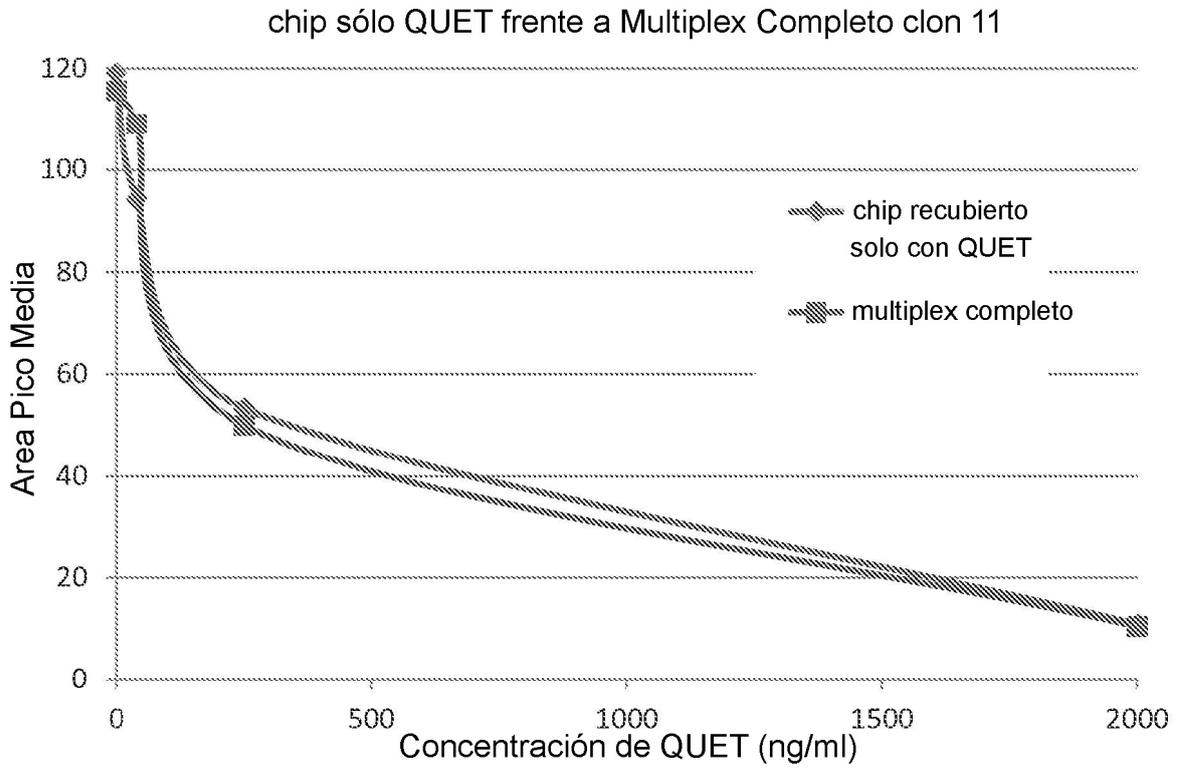


Fig. 21

chip sólo RISP frente a Multiplex Completo Clon 5-9

