

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 565**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013 PCT/US2013/055729**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 13753972 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2888263**

54 Título: **Haptenos de risperidona y paliperidona**

30 Prioridad:

21.08.2012 US 201261691469 P

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

28.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HASPESLAGH, PIETER RIK;
VLIEGEN, MAARTEN;
HRYHORENKO, ERIC;
DECORY, THOMAS R. y
SANKARAN, BANUMATHI**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 669 565 T3

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

Haptenos de risperidona y paliperidona**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere al campo de inmunoensayos para determinar la presencia de risperidona y paliperidona en fluidos biológicos humanos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

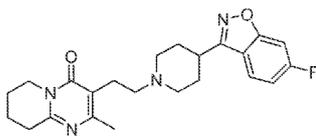
WO 2011/115733 A1 se refiere a conjugados e inmunógenos derivados de risperidona. La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico crónico y debilitador que afecta aproximadamente a 0,45-1% de la población mundial (van Os, J.; Kapur, S. "Schizophrenia" Lancet 2009, 374, 635-645). Los principales objetivos del tratamiento son conseguir una remisión continua de los síntomas psicóticos, reducir el riesgo y consecuencias de recaída y mejorar el funcionamiento del paciente y la calidad general de vida. Mientras muchos pacientes con esquizofrenia son capaces de conseguir estabilidad de los síntomas con la medicación anti-psicótica disponible, el cumplimiento inadecuado con la medicación es una razón común para recaída con medicaciones orales administradas diariamente. Varios estudios (Abdel-Baki, A.; Ouellet-Plamondon, C.; Malla, A. "Pharmacotherapy Challenges in Patients with First-Episode Psychosis" Revista de trastornos afectivos 2012, 138, S3S143) que investigan los resultados del no cumplimiento, han mostrado que los pacientes con esquizofrenia que no toman su medicación como se les ha prescrito tienen mayores índices de recaída, admisión en hospitales y suicidio así como una mayor mortalidad. Se estima que del 40 al 75% de pacientes con esquizofrenia presentan 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 with Chronic Schizophrenia" Revista New England de Medicina 2005, 353(12), 1209-1223): La monitorización terapéutica de fármacos (MTF) es la cuantificación de concentraciones de suero o plasma de fármacos, que incluyen fármacos anti-psicóticos, para el control y optimización del tratamiento. Tal monitorización permite, por ejemplo, la identificación de pacientes que no están cumpliendo con el régimen de su medicación, que no están consiguiendo dosis terapéuticas, que no reaccionan a las dosis terapéuticas, que han tenido una tolerancia sub-óptima, que tiene interacciones farmacocinéticas fármaco-fármaco o que tienen un metabolismo anormal que da como resultado concentraciones inapropiadas de plasma. Existe una variabilidad individual considerable en la habilidad del paciente para absorber, distribuir, metabolizar y excretar fármacos anti-psicóticos. Tales diferencias pueden estar causadas por una enfermedad simultánea, edad, medicación concurrente o peculiaridades genéticas. Las diferentes formulaciones de fármacos pueden también influenciar en el metabolismo de fármacos anti-psicóticos. MFT permite la optimización de dosis para pacientes individuales, mejorando los resultados terapéuticos y funcionales. MFT permite además a un médico que prescribe asegurar el cumplimiento con las dosis prescritas y la consecución de concentraciones efectivas de suero.

Hasta la fecha, los métodos para determinar los niveles de concentraciones de suero o plasma de fármacos anti-psicóticos incluyen el uso de cromatografía líquida (CL) con UV o detección de espectrometría de masa, y radioinmunoensayos (véase, por ejemplo, Woestenborghs et al., 1990 "On the selectivity of some recently RIA's" en Encuestas Metodológicas en Bioquímica y Análisis 20:241-246. Análisis de fármacos y metabolitos, incluyendo agentes anti-efectivos; Heykants et al., 1994 "The Pharmacokinetics of Risperidone in Humans: A Summary", J. Clin Psychiatry 55/5, supl: 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 uno o ambas de risperidona y paliperidona. Salamone et al., en la patente de Estados Unidos N° 8.088.594 desvela un inmunoensayo competitivo para risperidona que usa anticuerpos que detectan tanto risperidona como paliperidona pero no metabolitos farmacológicamente inactivos. Los anticuerpos usados en el ensayo competitivo se desarrollan contra un inmunógeno particular. ID Labs Inc. (Londres, Ontario, Canadá) comercializa un ELISA para olanzapina, otro fármaco anti-psicótico, que también utiliza un formato competitivo. Las instrucciones de uso indican que el ensayo está diseñado para fines de revisión y pretende tener uso forense y de investigación, y no pretender ser específicamente para uso terapéutico. Las instrucciones recomiendan que todas las muestras positivas deberían confirmarse con cromatografía de gas/espectrometría de masa (GC-MS), e indican que el anticuerpo usado detecta olanzapina y clozapina (véase ID Labs Inc., "Instrucciones para uso, hoja de datos IDEL-F083", Fecha Rev. Agosto 8, 2011). Algunos de estos métodos, concretamente HPLC y GC/MS, pueden ser caros y trabajosos, y generalmente solamente se realizan en laboratorios grandes y especializados que tienen el equipo apropiado.

Existe una necesidad de métodos para determinar los niveles de fármacos anti-psicóticos, particularmente métodos que puedan realizarse en la consulta de un médico que pueda prescribir (donde el tratamiento para un paciente individual pueda ajustarse como corresponde de una manera mucho más oportuna) y en otros escenarios médicos que carezcan de equipamiento para LC o GC/MS o que requieran resultados rápidos de pruebas:

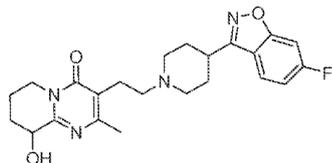
Risperidona es:

65



Paliperidona es:

5

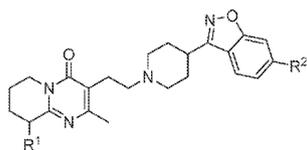


10

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 La invención objeto proporciona compuestos y conjugados que permiten tal método mejorado para determinar los niveles del fármaco anti-psicótico risperidona.

La invención comprende el compuesto de la Fórmula I



Fórmula 1

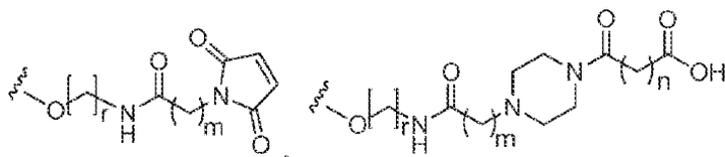
Donde:

30

R¹ es H, u OH;

R² es O(CH₂)_rNH₂.

35



40 O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
donde:

Z se selecciona del grupo consistente en:

- 45 -N(R⁴)-, -O-, -S-, -heteroalquilo-;
- R⁴ es H, un grupo alquilo, grupo cicloalquilo, grupo aralquilo o grupo arilo sustituido o no sustituido;
- Y es un grupo separador orgánico;
- G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
- p es 0 o 1;
- r es 1, 2, 3, 4 o 5;
- 50 m es 1, 2, 3, 4 o 5;
- n es 1, 2, 3, 4 o 5.

55 La invención comprende conjugados de compuestos de la invención con transportadores inmunogénicos tales como proteínas, y productos producidos mediante el proceso de poner en contactos los compuestos de la invención con transportadores inmunogénicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

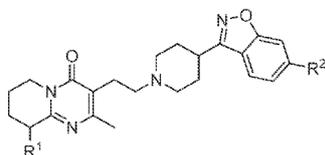
Las Figs. 1 y 2 muestran resultados de ELISA competitivo generados con hibridoma 5-9;
 La Fig. 3 muestra resultados de ELISA competitivo generados con risperidona clon 2A5;
 La Fig. 4 muestra el formato de inmunoensayo competitivo usado en el dispositivo de ensayo de flujo lateral; y
 La Fig. 5 muestra una curva de respuesta de dosis típica generada con risperidona clon 5-9.

Descripción detallada de la invención

La invención objeto proporciona compuestos y conjugados que permiten la determinación de niveles de fármacos anti-psicóticos. Tales métodos permitirán a los médicos evaluar objetivamente en una cita cómo de posible es que el empeoramiento de los síntomas del paciente sea debido a la falta de adherencia. Alternativamente, si se cumple, un médico puede considerar una elección diferente de tratamiento. La monitorización terapéutica de fármacos, que es posible mediante este método, es clave en la identificación de las opciones más efectivas de tratamiento. Además, los médicos creen que tal MTF les ayudará a moverse a una relación muy diferente con sus pacientes, esto es, a moverse de un análisis hipotético en la falta de adherencia al tratamiento hacia uno más colaborativo comprometiéndolo a los pacientes hacia un compromiso más activo en la optimización del régimen de tratamiento.

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

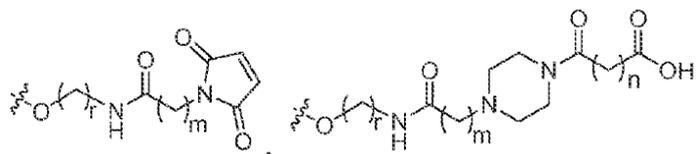
La invención comprende el compuesto de la Fórmula I



Fórmula 1

donde:

R¹ es H, u OH;
 R² es O(CH₂)_rNH₂,



O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;

donde:

Z se selecciona del grupo consistente en:
 -N(R⁴)-, -O-, -S-, -heteroalquilo-;
 R⁴ es H, un grupo alquilo, grupo cicloalquilo, grupo aralquilo o grupo arilo sustituido o no sustituido;
 Y es un grupo separador orgánico;
 G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
 p es 0 o 1;

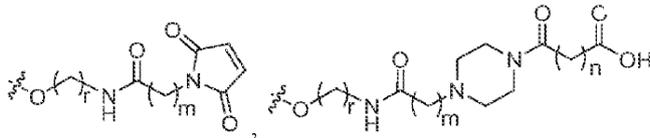
r es 1, 2, 3, 4 o 5;
 m es 1, 2, 3, 4 o 5;
 n es 1, 2, 3, 4 o 5.

La invención comprende el compuesto de la Fórmula I

5 Donde:

R¹ es H, u OH;
 R² es O(CH₂)_rNH₂,

10



O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
 donde:

15

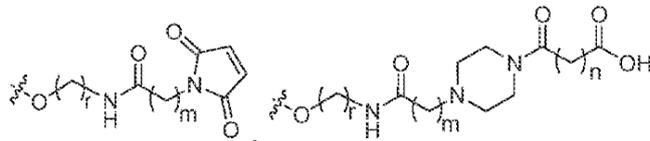
Z es O;
 Y es un grupo separador orgánico;
 G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
 p es 0 o 1;
 r es 1, 2, 3, 4 o 5;
 m es 1, 2, 3, 4 o 5;
 n es 1, 2, 3, 4 o 5.

20

25 La invención comprende el compuesto de la Fórmula I
 donde:

R¹ es H, u OH;
 R² es O(CH₂)_rNH₂,

30



O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
 donde:

35

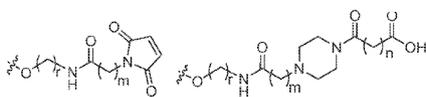
Z es O(CH₂)_rNH;
 Y es un grupo separador orgánico;
 G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
 p es 0 o 1;
 r es 1, 2, 3, 4 o 5;
 m es 1, 2, 3, 4 o 5;
 n es 1, 2, 3, 4 o 5.

40

45 La invención comprende el compuesto de la Fórmula I
 donde:

R¹ es H, u OH;
 R² es O(CH₂)_rNH₂,

50

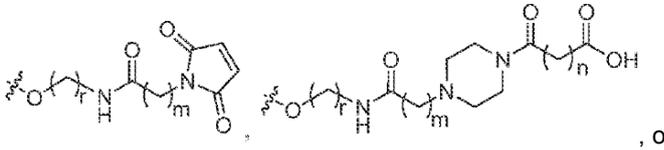


$O(CH_2)_rNHC(O)(CH_2)_mCO_2H$, o $Z-(Y)_p-G$;
donde:

- 5 Z es $O(CH_2)_rNH$;
Y es un grupo separador orgánico;
G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
p es 1;
r es 2;
10 m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

La invención comprende el compuesto de la Fórmula I
Donde:

- 15 R^1 es H, u OH;
 R^2 es $O(CH_2)_rNH_2$,

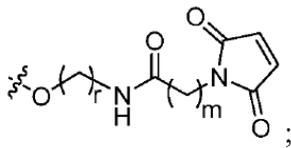


$O(CH_2)_rNHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
donde:

- 25 r es 2;
m es 1, 2, 3 o 4;
n es 1 o 2.

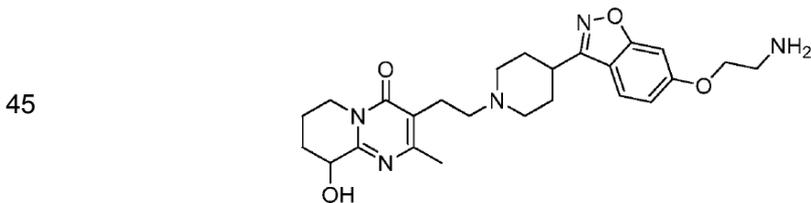
En otra realización de la invención:

- 30 R^1 es H, u OH; y
 R^2 es $O(CH_2)_rNH_2$, o



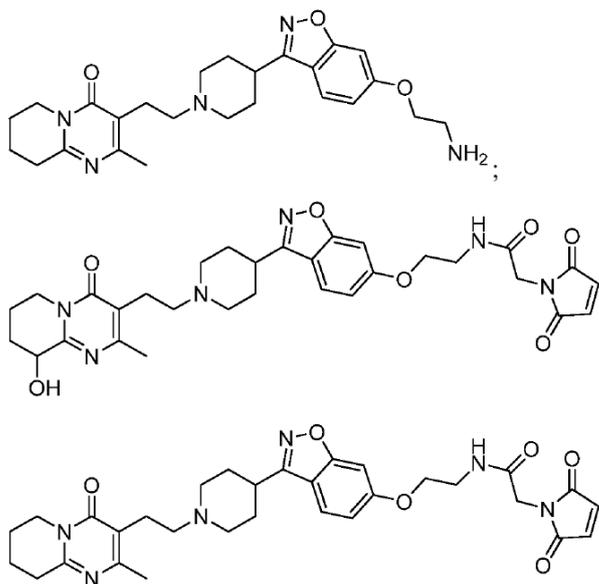
donde r es 2;
donde m es 1.

40 Otra realización de la invención es el compuesto



50

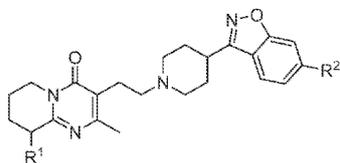
55



25 La invención proporciona además conjugados de los compuestos anteriores con un transportador inmunogénico, conjugados de los compuestos anteriores con proteínas y conjugados de los compuestos anteriores con las proteínas hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina y tiroglobulina bovina además de conjugados, como se define en las reivindicaciones producidos mediante el proceso de poner en contacto los compuestos de la invención con transportadores inmunogénicos.

30

La invención comprende un conjugado del compuesto de la Fórmula I



40

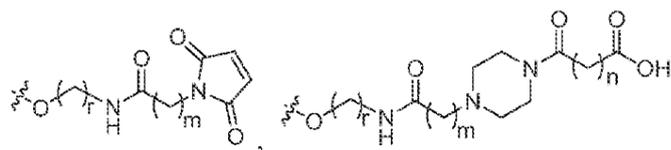
Fórmula I

donde:

45 R¹ es H, u OH;

R² es O(CH₂)_rNH₂,

50



O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;

donde:

55 Z se selecciona del grupo consistente en:

-N(R⁴)-, -O-, -S-, -heteroalquilo-;

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

Y es un grupo separador orgánico;

60 G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;

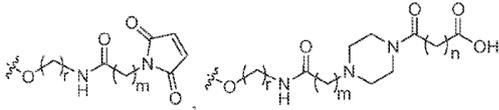
p es 0 o 1;

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

5

La invención comprende un conjugado del compuesto de la Fórmula I
 donde:

10 R¹ es H, u OH;
 R² es O(CH₂)_rNH₂,



15

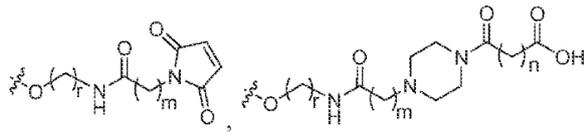
O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
 donde:

20 Z es O;
 Y es un grupo separador orgánico;
 G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
 p es 0 o 1;
 r es 1, 2, 3, 4 o 5;
 m es 1, 2, 3, 4 o 5;
 25 n es 1, 2, 3, 4 o 5; con un transportador inmunogénico.

La invención comprende un conjugado del compuesto de la Fórmula I
 donde:

30

R¹ es H, u OH;
 R² es O(CH₂)_rNH₂,



35

O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
 donde:

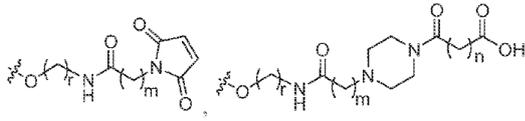
40 Z es O(CH₂)_rNH;
 Y es un grupo separador orgánico;
 G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
 p es 0 o 1;
 45 r es 1, 2, 3, 4 o 5;
 m es 1, 2, 3, 4 o 5;
 n es 1, 2, 3, 4 o 5; con un transportador inmunogénico.

La invención comprende un conjugado del compuesto de la Fórmula I
 donde:

50

R¹ es H, u OH;
 R² es O(CH₂)_rNH₂,

55



$O(CH_2)_rNHC(O)(CH_2)_mCO_2H$, o $Z-(Y)_p-G$;
donde:

5

Z es $O(CH_2)_rNH$;

Y es un grupo separador orgánico;

G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;

p es 1;

10 r es 2;

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

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

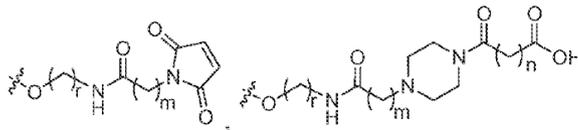
La invención comprende un conjugado del compuesto de la Fórmula I

15 donde:

R^1 es H, u OH;

R^2 es $O(CH_2)_rNH_2$;

20



25

$O(CH_2)_rNHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;
donde:

30

r es 2;

m es 1, 2, 3 o 4;

n es 1 o 2; con un transportador inmunogénico.

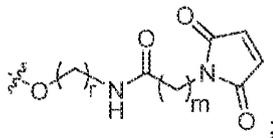
35

La invención comprende un conjugado del compuesto de la Fórmula I

R^1 es H, u OH; y

R^2 es $O(CH_2)_rNH_2$, o

40



45

donde r es 2;

donde m es 1; con un transportador inmunogénico.

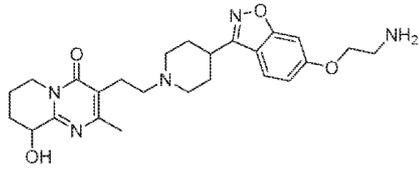
50

La invención comprende un conjugado del compuesto

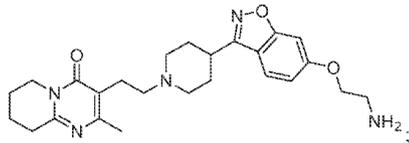
55

60

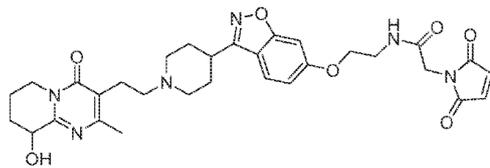
5



10

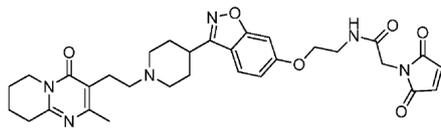


15



20

25



30

con un transportador inmunogénico.

35

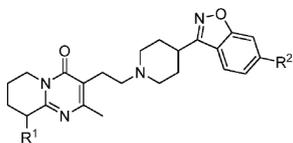
Otra realización de la invención es un conjugado de cualquiera de los compuestos anteriores de la Fórmula I y proteína.

Otra realización de la invención es un conjugado de cualquiera de los compuestos anteriores de Fórmula I y una proteína donde la proteína es hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina o tiroglobulina bovina.

40

La invención también proporciona conjugados como los definidos en las reivindicaciones formados a partir de un proceso de poner en contacto los compuestos anteriores con un transportador inmunogénico.

Otra realización de la invención es por lo tanto el conjugado como el definido en las reivindicaciones formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I

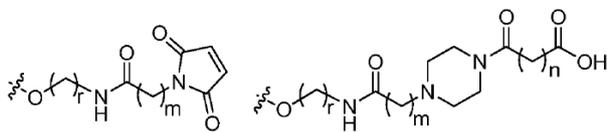


Formula I

55

donde:
 R^1 es H, u OH;
 R^2 es $O(CH_2)_rNH_2$,

60



$O(CH_2)_rNHC(O)(CH_2)_mCO_2H$, o $Z-(Y)_p-G$;
donde:

Z se selecciona del grupo consistente en:

5

$-N(R^4)-$, $-O-$, $-S-$, $-heteroalquilo-$;

R^4 es H, un grupo alquilo, grupo cicloalquilo, grupo aralquilo o grupo arilo sustituido o no sustituido;

Y es un grupo separador orgánico;

G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;

10

p es 0 o 1;

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

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

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

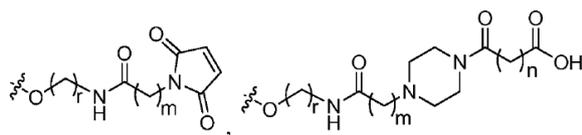
15

Otra realización de la invención es por lo tanto el conjugado como el definido en las reivindicaciones formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I donde:

20

R^1 es H, u OH;

R^2 es $O(CH_2)_rNH_2$,



25

$O(CH_2)_rNHC(O)(CH_2)_mCO_2H$, o $Z-(Y)_p-G$;
donde:

Z es O;

30

Y es un grupo separador orgánico;

G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;

p es 0 o 1;

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

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

35

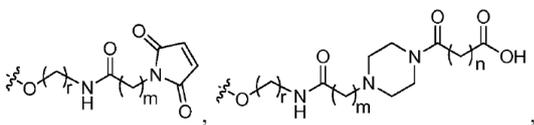
n es 1, 2, 3, 4 o 5; con un transportador inmunogénico.

Otra realización de la invención es por lo tanto el conjugado como el definido en las reivindicaciones formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I donde:

40

R^1 es H, u OH;

R^2 es $O(CH_2)_rNH_2$,



45

$O(CH_2)_rNHC(O)(CH_2)_mCO_2H$, o $Z-(Y)_p-G$;
donde:

Z es $O(CH_2)_rNH$;

50

Y es un grupo separador orgánico;

G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;

p es 0 o 1;

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

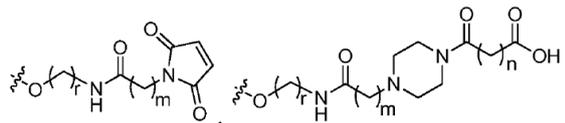
m es 1, 2, 3, 4 o 5;

55

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

Otra realización de la invención es por lo tanto el conjugado como el definido en las reivindicaciones formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I donde:

- 5 R¹ es H, u OH;
R² es O(CH₂)_rNH₂,



- 10 O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
donde:

Z es O(CH₂)_rNH;

Y es un grupo separador orgánico;

- 15 G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;

p es 1;

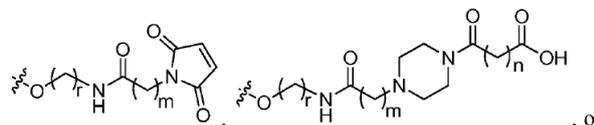
r es 2;

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

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

- 20 Otra realización de la invención es por lo tanto el conjugado como el definido en las reivindicaciones formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I donde:

- 25 R¹ es H, u OH;
R² es O(CH₂)_rNH₂,



- 30 O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
donde:

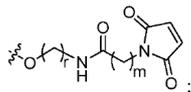
- 35 r es 2;

m es 1, 2, 3 o 4;

n es 1 o 2; con un transportador inmunogénico.

- 40 Otra realización de la invención es por lo tanto el conjugado como el definido en las reivindicaciones formado a partir del proceso de poner en contacto un compuesto de la Fórmula I
R¹ es H, u OH; y

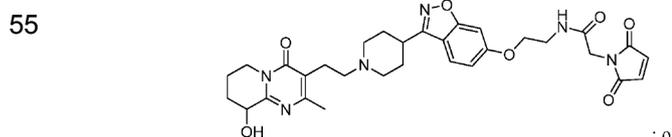
- 45 R² es O(CH₂)_rNH₂, o



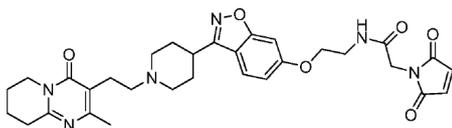
donde r es 2;

- 50 donde m es 1; con un transportador inmunogénico.

Otra realización de la invención es poner en contacto el compuesto



5



10

con un transportador inmunogénico.

15

Una realización preferente de la invención es el conjugado como se define en las reivindicaciones, formado a partir del proceso de poner en contacto cualquiera de los compuestos anteriores de la Fórmula I con un transportador inmunogénico donde el transportador inmunogénico es una proteína.

20

Una realización más preferente de la invención es el conjugado como se define en las reivindicaciones, formado a partir del proceso de poner en contacto cualquiera de los compuestos anteriores de la Fórmula I con un transportador inmunogénico donde el transportador inmunogénico es una proteína y donde la proteína es hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina o tiroglobulina bovina.

ABREVIATURAS

25

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

AMAS	N-(α -maleimidoacetoxi) succinimida éster
BTG	tiroglobulina bovina
Bu ₃ N	tributilamina
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DIEA	diisopropiletilamina
DMF	N,N-dimetilformadida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
KLH	hemocianina de lapa californiana
35 SATA	N-succinidimil S-acetiltioacetato
TEA	triethylamina
THF	tetrahidrofurano
TFA	ácido trifluoroacético
Et ₃ N	triethylamina
40 TBDMS	t-butildimetilsilil
DIC	diisopropilcarbodiimida
DMAP	N,N-dimetil-4-aminopiridina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidahidrocloruro
NHS	N-hidroxisuccinimida
45 TFP	Tetrafluorofenilo
PNP	p-nitrofenilo
TBTU	O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato
HOBT	N-hidroxibenzotriazol
DEPBT	3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotrazi- 4(3H)-uno
50 BOP-Cl	Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)cloruro fosfónico
DTT	ditioeritrol

DEFINICIONES

55

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

60

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

65

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

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

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

20 Los transportadores inmunogénicos también pueden incluir amino-polisacáridos, que son un polímero de alto peso molecular creados mediante condensaciones repetidas de monosacáridos. Ejemplos de polisacáridos son almidones, glicógenos, celulosa, gomas de carbohidrato tales como goma arábiga, agar y etcétera. El polisacáridos también contiene residuos de poli(aminoácido) y/o residuos de lípidos.

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

30 El transportador inmunogénicos también puede incluir partículas sólidas. Las partículas tienen generalmente al menos 0,02 micrones (μm) y no más de aproximadamente 100 μm , y normalmente desde aproximadamente 0,05 μm a 10 μm de diámetro. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, óptimamente de una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente desde aproximadamente 0,7 a 1,5 g/mL, y compuesta por materiales tales como células y microorganismos, incluyendo sin limitar ejemplos tales como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, Streptococcus, Staphylococcus aureus, E. coli y virus. Las partículas también pueden estar formadas por polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, látex, vesículas de fosfolípido o lipoproteínas.

35 El término “derivado” se refiere a un compuesto químico o molécula hecha de un compuesto matriz mediante una o más reacciones químicas.

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

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

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

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

5 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 parte 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 (tal como una etiqueta o transportador). El hapteno puede unirse de esta manera a una fracción tal como biotina para formar un compañero de enlace competitivo para el hapteno.

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

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

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

30 El término "alquilo" se refiere a radicales de cadena lineal y ramificada de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique lo contrario, y específicamente pretende incluir radicales que tienen cualquier grado o nivel de saturación. Alquilo incluye, aunque no se limita 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. El término "cicloalquilo" se refiere a un radical de anillo de hidrocarburo saturado o parcialmente no saturado monocíclico o bicíclico compuesto de 3 a 10 átomos de carbono. Los sustituyentes de alquilo pueden estar opcionalmente presentes en el anillo. Ejemplos incluyen ciclopropilo, 1,1-dimetil ciclobutilo, 1,2,3-trimetilciclopentilo, ciclohexilo y ciclohexenilo.

40 El término "heteroátomo" se refiere a un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo de fósforo o un átomo de sulfuro donde los átomos de nitrógeno, fósforo y sulfuro pueden existir en cualquiera de los estados de oxidación permitidos.

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

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

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

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

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

El término "polialcoxialquilo" se refiere a compuestos alcoxi de cadena larga e incluye glicoles de polietilenos de tamaños discretos o monodispersados.

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

5 El término "carboxialquilo" se refiere al menos a un grupo carboxilato unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo. Los términos "grupo carboxilato" incluyen ácidos carboxílicos y éteres de alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquil carboxilato.

10 El término "alquilcabonilo" se refiere a un grupo que tiene un grupo carbonilo unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

15 El término "heteroarilo" se refiere a radicales de anillo aromáticos mono o bicíclicos de 5 a 7 miembros o de 8 a 10 miembros, consistiendo cada anillo de ellos en de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O u S donde los átomos de nitrógeno y sulfuro pueden existir en cualquier estado de oxidación permitido. Ejemplos incluyen benzimidazolilo, benzotiatolilo, benzotienilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolinilo, tiazolilo y tienilo.

20 El término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo C₁₋₆ alquilo que tiene un sustituyente de heteroarilo. Ejemplos incluyen furiletilo y 2-quinolinilpropilo.

El término "alcoxi" se refiere a radicales de cadena recta o ramificada de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique lo contrario, unidos a un átomo de oxígeno. Ejemplos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi y butoxi.

25 El término "arilo" se refiere a radicales aromáticos monocíclicos o bicíclicos que contienen de 6 a 12 carbonos en el anillo. Los sustituyentes de alquilo pueden estar opcionalmente en el anillo. Ejemplos incluyen fenilko, bifenilo y naftaleno.

30 El término "aralquilo" se refiere a un grupo C₁₋₆ alquilo que contiene un sustituyente de alquilo. Ejemplos incluyen bencilo, feniletilo o 2-naftilmetilo.

El término "heteroalquilo" se refiere a un grupo C₁₋₆ alquilo que contiene un sustituyente de heteroarilo. Ejemplos incluyen furilmetilo y piridilpropilo.

35 El término "ariloxi" se refiere a un átomo de oxígeno unido a un sustituyente de arilo. Ejemplos incluyen fenoxi y benciloxi.

40 El término "arilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi unido a un sustituyente de arilo. Ejemplos incluyen éter de fenilmetilo.

El término "acilo" se refiere al grupo -C(O)R_a, donde R_a es alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo y heteroaralquilo. Un "agente acilante" añade el grupo -C(O)R_a a una molécula.

45 El término "sulfonilo" se refiere al grupo -S(O)₂R_a, donde R_a es un hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo y heteroaralquilo. Un "agente sulfonante" añade el grupo -S(O)₂R_a a una molécula.

50 Los separadores que tienen grupos de enlace funcionales para la unión de haptenos a fracciones del transportador pueden prepararse mediante una amplia variedad de métodos. El separador puede formarse usando una molécula que se activa o funciona de manera diferente con grupos en cualquier extremo para permitir la reacción secuencial selectiva con el hapteno y el transportador, pero la misma fracción reactiva puede también usarse en ambos extremos. Los grupos seleccionados para la reacción con el hapteno y el grupo de enlace funcional para unirse al transportador pueden determinarse mediante el tipo de funcionalidad en el hapteno y el transportador con el que el hapteno se unirá. Los separadores y métodos de unión con haptenos y transportadores incluyen, aunque no se limitan a, aquellos descritos por Brinkley, M., A. Bioconjugate Chem 1992, 3:2-13, Hermanson, Greg T., Bioconjugate Techniques., Academic Press, Londres, Amsterdam, Burlington, MA, USA, 2008 y Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook; disponible para descargar o en papel de Thermo Scientific 3747 N Meridian Rd, Rockford, IL USA 61101, ph 800-874-3723 o en <http://www.piercenet.com/> y referencias en ella. Muchas moléculas diferencialmente activadas para la formación de grupos separadores están comercialmente disponibles por parte de vendedores, por ejemplo Thermo Scientific.

65 Para haptenos que tienen un grupo amino, los modos de unión del separador con el hapteno incluyen la reacción de la amina en el hapteno con un bloque constructor de separador que tiene un haluro de acilo o éster activo. Los "ésteres activos" se definen como ésteres que sufren reacción con un grupo nucleofílico, por ejemplo un grupo amino, bajo condiciones suaves para formar una unión estable. Una unión estable se define como la que

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

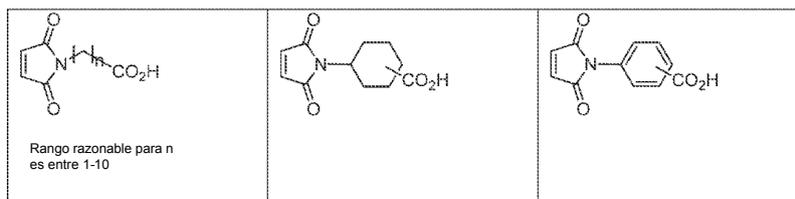
Tabla 1

25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		Valores razonables para m y n son entre 1 y 10

El enlace directo de la amina en el hapteno y una funcionalidad del ácido carboxílico en el bloque constructor del separador en presencia de un agente de enlace también puede usarse como un modo de unión. Los reactivos preferentes son aquellos típicamente usados en síntesis de péptidos. Los reactivos de unión peptídica incluyen, aunque no se limitan a, O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU, CAS #125700-67-6), véase: Pruhs, S., Org. Process. Res. Dev. 2006, 10:441; N-Hidroxibenzotriazol (HOBT, CAS #2592-95-2) con un agente deshidratante de carbodiimida, por ejemplo N-N-dicitclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidahidrocloruro (EDC), véase: König W., Greiger, R. Chem. Ver., 1970, 103 (3):788; 3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotrazin-4(3H)-uno (DEBPT, CAS #65534-

43-0), véase: Liu, H. et al., Chinese Chemical Letters, 2002, 13(7):601; Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)cloruro fosfónico; (BOP-Cl, CAS #68641-49-6), véase: Diago-Mesegure, J. et al., Synthesis, 1980, 7:547-51 y otros descritos en detalle por Benoiton en 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 referencias en él. Estos métodos crean una unión estable de amida que une el hapteno con el separador. Se muestran ejemplos de separadores que pueden obtenerse usando métodos conocidos y unidos a los haptenos que tienen amino que utilizan la optimización rutinaria de condiciones de reacción empleando los métodos descritos y citados anteriormente, pero no se limitan a aquellos en la Tabla 2. Estos separadores permiten la unión del hapteno con un grupo tiol en un transportador.

Tabla 2



Los separadores también pueden construirse de una manera en forma de etapas mediante unión secuencial de grupos químicos apropiados con el hapteno que incluye la etapa de formar el grupo de enlace funcional que es capaz de unirse con el transportador. Véase ejemplos ilustrativos bajo Esquemas Generales de Reacción.

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

Para haptenos que contienen un grupo de ácido carboxílico, los modos de unión de una parte separadora con el 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, cuya preparación se ha descrito previamente, seguido de reacción con un grupo amino (-NH₂-), hidracinio (-NH-NH₂-), hidrácido (-C(O)-NH-NH₂-) o grupo hidroxilo (-OH) en la parte separadora para formar una amida, hidracida, diacilhidracina o enlace de éster, o una unión directa del grupo de ácido carboxílico con un grupo amino en la parte separadora o directamente en el transportador con un reactivo que se acopla al péptido y/o reactivo que deshidrata carbodiimida, previamente descritos, ejemplos de los cuales se muestran en las Tablas 4 y 5. Los procedimientos encontrados pen referencias previamente citadas para la formación de éteres activados y uso de agentes que se acoplan a péptidos pueden emplearse para la formación de haptenos que tienen ácido carboxílico con bloques constructores de separadores y transportadores de proteínas con grupos amino disponibles que utilizan optimización rutinaria de condiciones de reacción.

Tabla 3

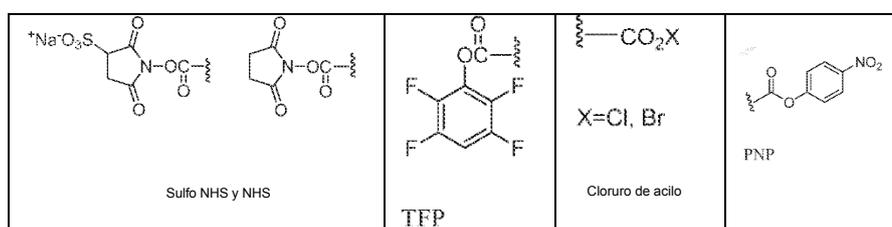


Tabla 4

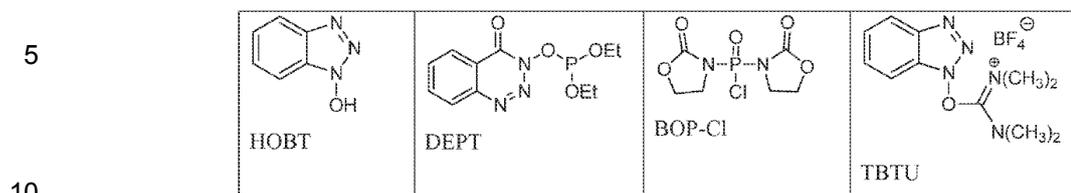
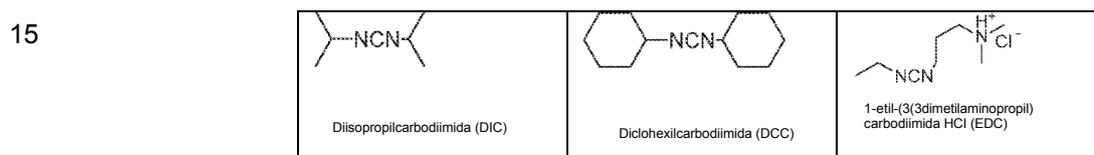
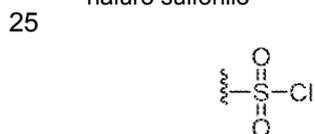


Tabla 5



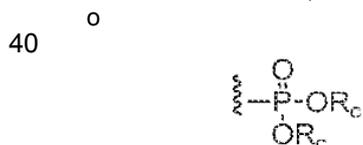
Otros grupos electrofílicos pueden estar presentes en el hapteno para unirse al separador, por ejemplo, un haluro sulfonilo



30 o un grupo fosforoso electrofílico, por ejemplo:



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

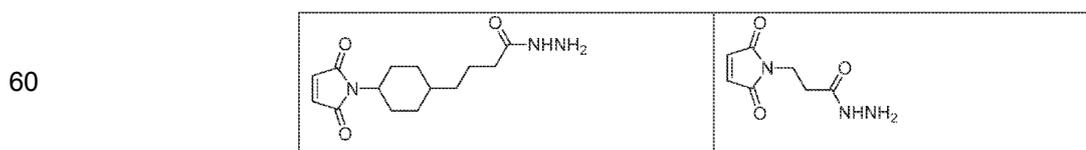


45 R_c es alquilo, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo.

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

50 Los haptenos que tienen grupos de aldehído o cetona pueden unirse a separadores usando métodos que incluyen, aunque no se limitan a, la reacción con un grupo hidracida N2N-NH-C(O)- en un separador para formar una acilhidrazona, véase: Chamow, S.M., Kogan, T.P., Peers, D.H., Hastings, R.C., Byrn, R.A y Askenaszi, A., J. Biol. Chem., 1992, 267(22): 15916. Ejemplos de grupos separadores de hidracida bifuncionales que permiten la unión con un grupo tiol en el transportador se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

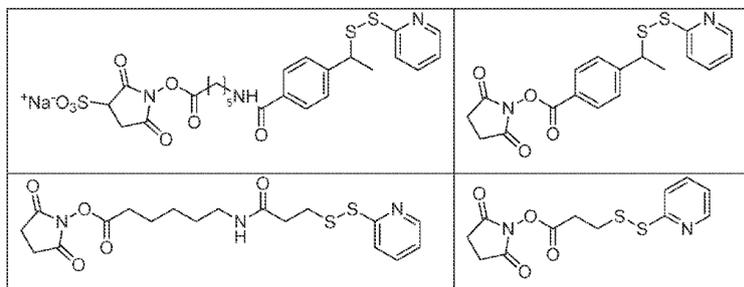


Los haptenos pueden también contener grupos tiol que pueden reaccionar con el transportador siempre y cuando el transportador se haya modificado para proporcionar un grupo que pueda reaccionar con el tiol. Los grupos transportadores pueden modificarse mediante métodos que incluyen, aunque no se limitan a, unión de un grupo que contiene un grupo funcional de maleimida mediante reacción con un grupo amino en el transportador con N-Succinimidil maleimidoacetato (AMAS, CAS# 55759-61-3), Succinimidil yodoacetato (CAS# 151199-81-4), o cualquiera de los grupo separadores bifuncionales mostrados en la Tabla 1 para introducir un grupo que está sometido a una reacción dando como resultado una unión del hapteno con el transportador.

El grupo de enlace funcional capaz de formar un enlace con el transportador puede ser cualquier grupo capaz de formar un enlace estable y puede ser reactivo a un número de diferentes grupos en el transportador. El grupo de enlace funcional puede reaccionar preferentemente con un grupo amino, un grupo de ácido carboxílico o un grupo tiol en el transportador, o 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 previamente), isocianato, isotiocianato, haluro de alquilo, grupo amino, grupo tiol, grupo maleimida, grupo acrilato ($H_2C=CH-C(O)-$ o grupo de vinilo sulfona $H_2C=CH-SO_2-$) Véase: J.W., et al., *Bioconjugate Chem.*, 2012, 23(3):350. El grupo de enlace funcional puede estar presente como parte de un bloque constructor de separador diferencialmente activado que puede reaccionar en forma de etapas con el hapteno y el derivado de hapteno resultante puede después reaccionar con el transportador. Alternativamente, el hapteno puede derivarse con un separador que tiene un grupo precursor que puede transformarse en el grupo de enlace funcional mediante una reacción posterior. Cuando el grupo de enlace funcional en el separador es una amina o un grupo de ácido carboxílico, la reacción de enlace con el grupo de ácido carboxílico o amina en el transportador puede realizarse directamente mediante el uso de reactivos que se acoplan a péptidos de acuerdo con procedimientos en las referencias citadas anteriormente para estos reactivos.

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

Tabla 7



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

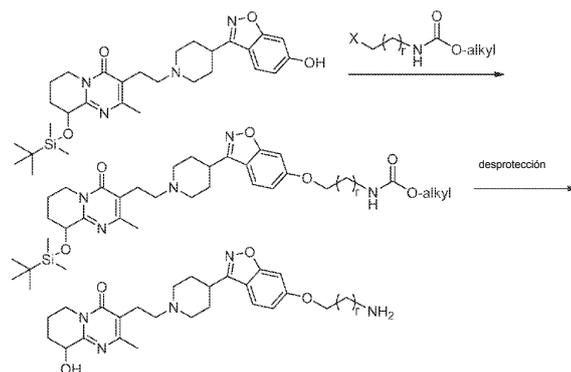
ESQUEMAS GENERALES DE REACCIÓN

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

La unión de un separador a la estructura matriz anillo de risperidona puede llevarse a cabo mediante el uso del compuesto de inicio protegido con sililo mostrado en el Esquema 1, cuya preparación se describe en el Ejemplo 1. La alquilación con un derivado haloalquilo protegido con N también se describe en el Ejemplo 1. Los derivados de

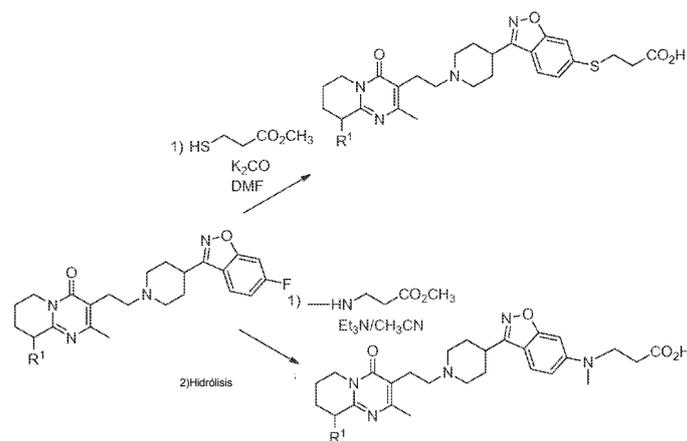
haloalquilo protegidos con N de varias longitudes de cadena están disponibles en el mercado o puede hacerse mediante reacciones orgánicas estándares conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los valores preferentes para r son entre 1 y 5. La desprotección como la descrita en el Ejemplo 1 puede proporcionar un compuesto amino que puede además elaborarse para unir átomos separadores adicionales o pueden unirse directamente al transportador. Los derivados del compuesto amino que carecen de grupo hidroxilo en el producto final pueden hacerse como se describe en el Ejemplo 3.

Esquema 1



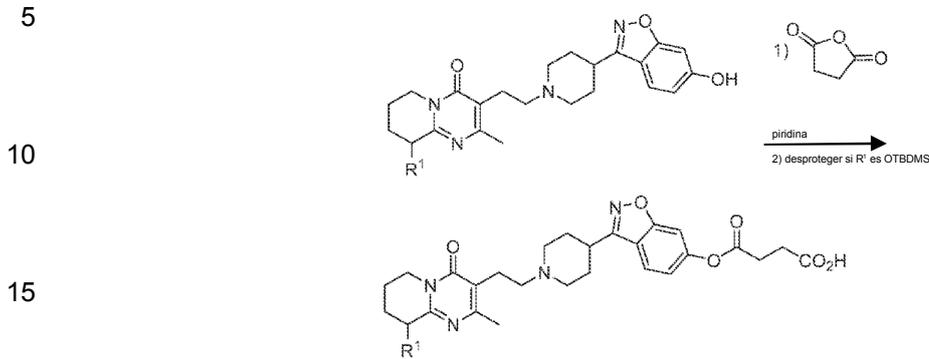
La alquilación de risperidona también puede llevarse a cabo usando un tiol, por ejemplo, 3-mercaptometilpropionato, usando el método de Wang, J., et al., Bioorganic and Med. Chem. Letters, 2010, 20:7159, usando K_2CO_3 en DMF seguido de hidrólisis con NaOH en THF acuoso, como se muestra en el Esquema 2, para proporcionar un análogo del hapteno que tiene un enlace de tioalquilo que termina en un grupo carboxi que puede unirse directamente a un transportador o elaborarse más para extenderse a la parte separadora. La alquilación con una amina puede realizarse también como se muestra en el Esquema 2, de acuerdo con el método usado en para hacer el intermediario 525 en US20110245224. Las versiones de los análogos de aminoalquilo o tioalquilo del Esquema 2 donde R_1 es OH o H pueden hacerse mediante optimización rutinaria de los procedimientos químicos mostrados en las referencias anteriormente mencionadas por un químico experto.

Esquema 2

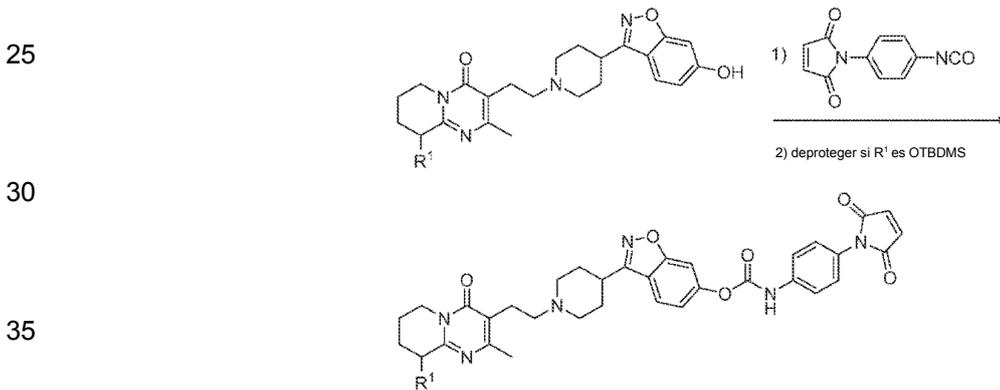


El grupo hidroxilo fenólico del compuesto de inicio mostrado en el Esquema 3, donde R_1 es bien H o un alcohol protegido por sililo, puede ser el sitio de introducción de un grupo que tiene un grupo de enlace funcional para unión con un transportador. El compuesto fenólico puede reaccionar directamente con anhídrido succínico como se muestra en el Esquema 3 y se describe en US2006251592 para proporcionar un intermediario que tiene carboxi, o puede reaccionar con un separador bifuncional de isocianato, como se muestra en el Esquema 4, de acuerdo con la referencia de Annunziato que se proporciona en otra parte en esta divulgación para proporcionar un hapteno que tiene un enlazador funcional reactivo con tiol. La desprotección como la descrita en los ejemplos posteriores es necesaria cuando R_1 es un alcohol protegido con sililo.

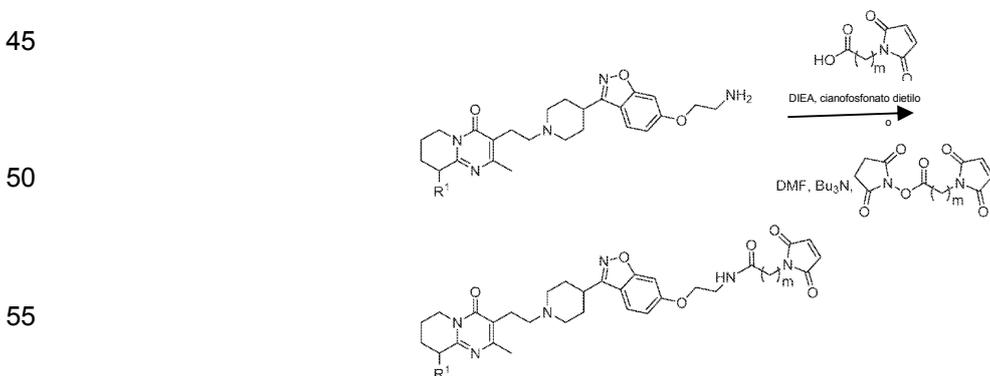
Esquema 3



Esquema 4



Esquema 5



60 El Esquema 5 ilustra cómo haptenos con separadores que terminan en un grupo de alquilamina, como los Ejemplos 1 y 2, pueden además funcionar con un grupo de maleimida. La maleimida puede introducirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la reacción con aminoácido de alquilo N-maleoil-sustituido y reactivos de enlace como diisopropiletilamin ay dietil cianofosfonato da el separador funcionalizado con maleimida. La reacción de la risperidona derivó amina con grupo que funcionaliza alquil-maleimida, como 2,5-dioxopirrolidina-1-il 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato, en un disolvente tal como DMF, en presencia de una base, como

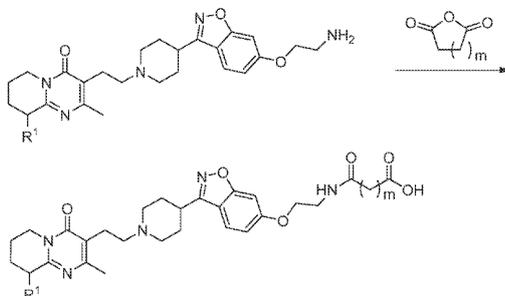
tributilamina, a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora, genera haptenos con un separador funcionalizado con maleimida.

Esquema 6

5

10

15



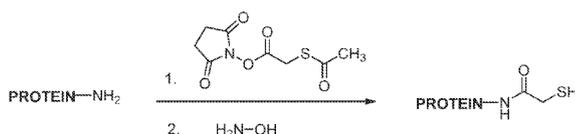
20

Los haptenos con separadores que terminan en un grupo de alquilamina pueden elaborarse mediante reacción con un compuesto de anhídrido cíclico, como anhídrido succínico o anhídrido glutárico, como se muestra en el Esquema 6. La reacción puede realizarse en un disolvente tal como THF, a temperatura ambiente, durante la noche.

Esquema 7

25

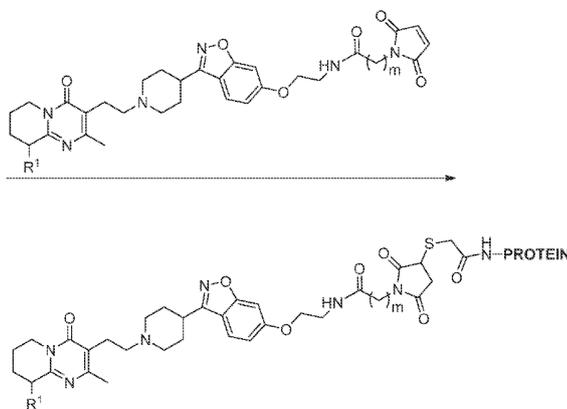
30



35

40

45



50

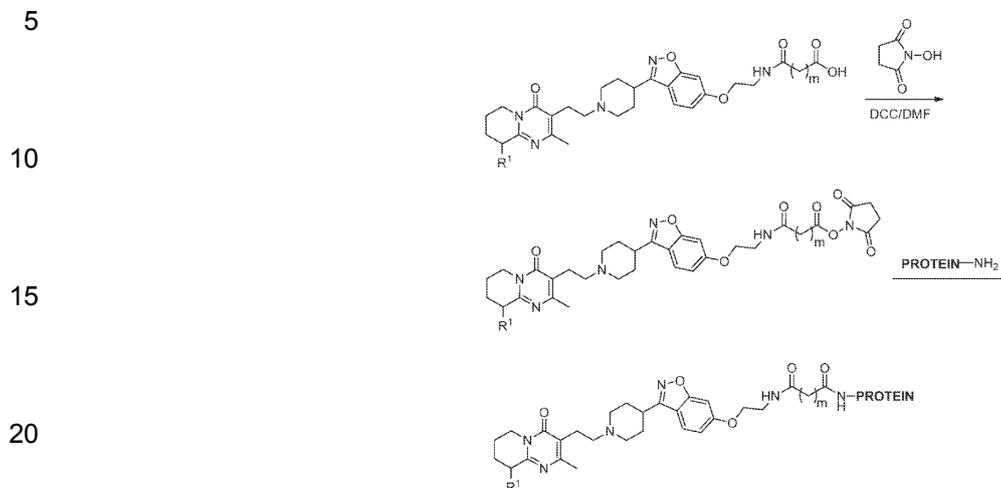
Los haptenos funcionalizados con maleimida pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 7. La activación de residuos de lisina de proteína mediante acilación del epsilon-nitrógeno con N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), seguido de posterior hidrólisis del grupo S-acetilo con hidroxilamina produce un grupo nucleofílico sulfhidrilo. La conjugación de la proteína activada con sulfhidrilo con el hapteno derivado de maleimida (preparado como se describe en general en el Esquema 5) continúa mediante una reacción de adición Michael. Las proteínas adecuadas son conocidas por aquellos expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina.

55

60

65

Esquema 8



25 Los haptenos funcionalizados con ácido carboxílico pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 8. La reacción con N-hidroxisuccinimida y un agente de enlace adecuado, como diciclohexilcarbodiimida (DCC) y una base, como tributilamina, en un disolvente tal como DMF a una temperatura de aproximadamente 20°C, durante aproximadamente 18 horas, activa el ácido carboxílico con el grupo que abandona N-hidroxisuccinimida. El separador activado y el hapteno pueden después conjugarse con una proteína en un disolvente tal como amortiguador de fosfato a pH 7,5 a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 2,5 horas. Las proteínas adecuadas son conocidas por aquellos expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina.

30

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

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

40

45

50

Habiendo proporcionado los conjugados de la invención objeto, que comprenden los compuestos aquí expuestos y un transportador inmunogénico, pueden generarse anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados, que se enlazan con el fármaco anti-psicóticos. Tales anticuerpos que se contemplan particularmente incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales así como fragmentos de los mismos, por ejemplo, proteínas recombinantes, que contienen el dominio de enlace con antígeno y/o uno o más regiones determinantes de complementariedad de estos anticuerpos. Preferentemente, el anticuerpo se enlazará con el fármaco y cualquier metabolito farmacológicamente activo deseado. Al alterar la localización de la unión de un transportador inmunogénico en un conjugado de fármaco, pueden fabricarse en los anticuerpos la selectividad y reactividad cruzada con metabolitos y/o fármacos relacionados. Para risperidona, la reactividad cruzada con metabolitos de risperidona como 9-hidroxisperidona (paliperidona, que también se administra como un fármaco anti-psicótico), 7-hidroxisperidona y N-dealquilrisperidona pueden o no pueden ser deseables. Un anticuerpo que reacciona de manera cruzada con risperidona y paliperidona puede ser deseable, que no reaccione con 7-hidroxisperidona o N-dealquilrisperidona, detectando así risperidona y su principal metabolito farmacológicamente

55

60

65

activo. Alternativamente, puede ser deseable detectar los metabolitos farmacológicamente activos, risperidona y paliperidona, por separados, mientras no se detectan metabolitos inactivos, 7-hidroxirisperidona y N-dealquirisperidona. Pueden generarse anticuerpos que detecten múltiples de estos fármacos y/o metabolitos, o pueden generarse anticuerpos que detectan cada uno por separado (definiendo así las propiedades “de enlace específico” del anticuerpo). Un anticuerpo que se enlaza específicamente con uno o más compuestos cuando su enlace de uno o más compuestos es equimolar o sustancialmente equimolar.

Los métodos para producir tales anticuerpos comprenden la inoculación de un huésped con el conjugado (el compuesto y el transportador inmunogénico siendo un inmunógeno) representando las características de la presente invención. Los huéspedes adecuados incluyen, aunque no se limitan a, ratones, ratas, hámsteres, cerdos de guinea, conejos, pollos, burros, caballos, monos, chimpancés, orangutanes, gorilas, humanos y especies capaces de montar una respuesta inmune madura. Los procedimientos de inmunización están bien establecidos en la técnica y se exponen en numerosos tratados y publicaciones que incluyen “The Immunoassay Handbook”, 2ª Edición, editado por David Wild (Nature Publishing Group, 2000) y las referencias aquí citadas.

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

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

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

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

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

Preferentemente, las células inmortalizadas que se fusionan eficientemente pueden aislarse de poblaciones mezcladas mediante la selección en un medio tal como HAT, y soportar la expresión estable y de alto nivel de anticuerpo después de la fusión. Las líneas celulares inmortalizadas preferentes incluyen líneas celulares de mieloma disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA.

Debido a que las células de hibridoma típicamente secretan anticuerpo extracelularmente, el medio de cultivo puede someterse a ensayo para la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para el fármaco anti-psicótico. Puede usarse inmunoprecipitación de ensayos de enlace in vitro, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente enlazado con enzima (ELISA), para medir la especificidad de enlace de anticuerpos monoclonales.

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

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

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos recombinantes como los descritos en la patente de Estados Unidos N° 4.166.452. Los anticuerpos monoclonales que codifican ADN pueden aislarse y secuenciarse usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se enlazan específicamente con genes de cadena de anticuerpos murinos pesadas y ligeras, preferentemente para sonda ADN aislado de líneas de hibridoma de anticuerpo monoclonal que secretan anticuerpos específicos para fármacos anti-psicóticos.

INMUNOENSAYOS

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

Puede proporcionarse también un kit de reactivo que comprende un anticuerpo como se ha descrito anteriormente. Un kit de reactivo representativo puede comprender un anticuerpo que se enlaza con el fármaco anti-psicótico, risperidona, un complejo que comprende un análogo de un fármaco anti-psicótico o un derivado del mismo que se acopla a una fracción de etiquetado, y puede también opcionalmente comprender uno o más calibradores que comprendan una cantidad conocida de un fármaco anti-psicótico o una estándar relacionado.

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

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

Las solicitudes co-pendientes tituladas "Haptens of Aripiprazole" (Expediente N° PRD3265USPSP, primer nombre del inventor: Remmerie), "Haptens of Olanzapine" (Expediente N° PRD3266USPSP, primer nombre del inventor: Remmerie), "Haptens of Paliperidone" (Expediente N° PRD3267USPSP, primer nombre del inventor: Remmerie), "Haptens of Quetiapine" (Expediente N° PRD3268USPSP, primer nombre del inventor: Remmerie), "Haptens of Risperidone and Paliperidone" (Expediente N° PRD3269USPSP, primer nombre del inventor: Remmerie), "Antibodies to Aripiprazole Haptens and Use Thereof" (Expediente N° CDS5128USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Olanzapine Haptens and Use Thereof" (Expediente N° CDS5132USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Paliperidone Haptens and Use Thereof" (Expediente N° CDS5126USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Quetiapine Haptens and Use Thereof" (Expediente N° CDS5134USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Risperidone Haptens and Use Thereof" (Expediente N° CDS5130USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Aripiprazole and Use Thereof" (Expediente N° CDS5129USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Olanzapine and Use Thereof" (Expediente N° CDS5133USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Paliperidone and Use Thereof" (Expediente N° CDS5127USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Quetiapine and Use Thereof" (Expediente N° CDS5135USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko), "Antibodies to Risperidone and Use Thereof" (Expediente N° CDS5131USPSP, primer nombre del inventor: Hryhorenko).

EJEMPLOS

Los compuestos representativos de la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos sintéticos generales descritos más abajo. Los compuestos de la Fórmula (I) pueden prepararse mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los siguientes ejemplos solamente pretenden representar ejemplos de la invención.

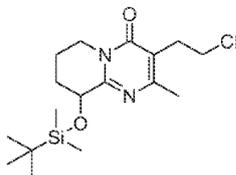
Ejemplo 1

Etapa A

9-((tert-butildimetilsilil)oxi)-3-(2-cloroetil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno

5

10



15

20

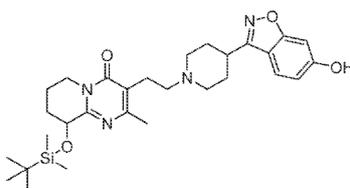
Una solución de 3-(2-cloroetil)-9-hidroxi-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno (1,0 g, 4,12 mmol) en DMF (5 mL) se trató con 1H-imidazol (701,24 mg, 64,66 mmol), seguido de una solución de t-butildimetilclorosilano (683,12 mg, 4,53 mmol) en DMF (1 mL). Después de agitación durante 18 horas a temperatura ambiente, los disolventes se retiraron bajo vacío y el residuo se absorbió en diclorometano/agua (10 mL/ 10 mL) con la adición de una espátula de carbonato de potasio. Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, filtraron y el disolvente se retiró bajo vacío. La mezcla cruda se usó sin más purificación en la siguiente etapa. (ESI-MS (M+1) 357).

Etapa B

25

9-((tert-butildimetilsilil)oxi)-3-(2-(4-(6-hidroxibenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno

30



35

40

Una solución de 3-(2-cloroetil)-9-hidroxi-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno, preparada como se ha descrito en la etapa anterior, (0,5 g, 1,40 mmol) en metanol (25 mL) y diisopropiletilamina (732,83 μL, 4,20 mmol) se trató con 3-(piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-ol sal de hidrocloreuro (374,62 mg, 1,47 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó durante 17 horas a 60°C bajo argón. Se añadió diisopropiletilamina (732,83 μL, 4,20 mmol) y la mezcla se agitó además durante 4 horas a 60°C. La mezcla de la reacción se evaporó bajo vacío y el residuo se absorbió en agua (25 mL), extrajo con cloroformo (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, filtraron y el disolvente se retiró bajo vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (elución con diclorometano/metanol (98/2) para dar el compuesto del título (ESI-MS (M+1) 359).

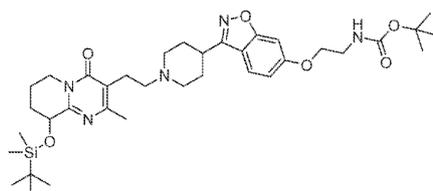
45

Etapa C

50

Tert-butil 2-((3-(1-(2-(9-((tert-butildimetilsilil)oxi)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il(etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)carbamato

55



60

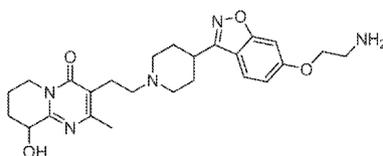
Una solución de 9-((tert-butildimetilsilil)oxi)-3-(2-(4-(6-hidroxibenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno, preparada como se ha descrito en la etapa anterior, (50 mg, 0,093 mmol) en acetona (0,5 mL) y DMF (0,5 mL) se trató con carbonato de potasio (33,3 mg, 0,24 mmol) y N-Boc-2-bromoaminoetano (27 mg, 0,12 mmol), y la mezcla de la reacción se agitó durante 17 horas a 60°C bajo argón. La mezcla de la reacción se evaporó a 40°C bajo presión reducida y se disolvió en agua (10 mL) y se extrajo con

diclorometano (3 x 10 mL). Las capas orgánicas se combinaron, secaron sobre Na₂SO₄, filtraron y el disolvente se evaporó para producir el compuesto crudo del título. (ESI-MS (M+1) 682).

Etapa D

5 3-(2-(4-(6-(2-aminoetoxi)benzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-9-hidroxi-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno

10



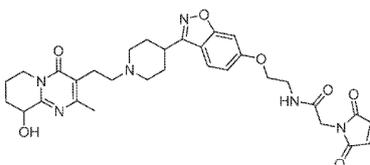
15

Una solución de tert-butil 2-((3-(1-(2-(9-((tert-butildimetilsilil)oxi)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il(etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)carbamato, preparada como se ha descrito en la etapa anterior, (70 mg, 0,103 mmol) en HCl/isopropanol (10 mL, 5 N) se agitó durante 1 hora a 60°C. La mezcla de la reacción se evaporó a 40°C bajo presión reducida y se disolvió cuidadosamente en solución acuosa de bicarbonato sódico saturado (5 mL) y se extrajo con diclorometano (3 x 10 mL). Las capas orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, filtraron y evaporaron bajo presión reducida a 40°C. La capa acuosa aún contenía producto, que se recuperó mediante evaporación de la capa acuosa hasta secarse a 40°C bajo presión reducida. El residuo resultante de la capa acuosa se volvió a disolver en agua y se colocó en una columna acondicionada Water Oasis SPE (6cc) y después se eluyó con metanol. La fracción de elución con metanol se combinó con el residuo de la extracción de diclorometano y se evaporó hasta secarse a 40°C bajo presión reducida para producir el compuesto del título junto con un producto secundario (ESI-MS (M+1) 468; siendo el producto secundario 5% 9-hidroxi-3-(2-(4-(6-hidroxibenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno (M+1) 425). La mezcla se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo 2

2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(2-((3-(1-(2-(9-hidroxi-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida

40



45

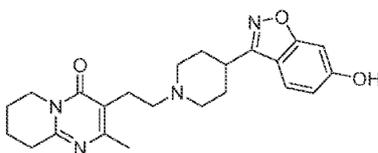
A una solución de 3-(2-(4-(6-(2-aminoetoxi)benzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-9-hidroxi-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1, (4,0 mg, 8,5 μmoles) en 215 μL de DMF y 4,3 μL de tributilamina se añadieron 214 μL de una solución DMF de N-(α-maleimidoacetoxi)succinimida éster (AMAS, 10 mg/mL, 2,1 mg, 8,5 μmoles). La solución resultante se dejó removiendo durante 60 minutos a 20°C, y después se usó como tal en reacción de conjugación con proteína activada con tiol.

Ejemplo 3

Etapa A

3-(2-(4-(6-hidroxibenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno

60

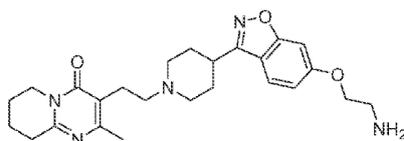


65

Una solución de 3-(2-cloroetil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2,a]pirimidin-4-uno (14,4 g, 0,05 mmol), 3-(piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-ol (14,0 g, 0,05 mmol), carbonato de sodio (16,0 g, 0,15 mmol) y yoduro de potasio (punta de espátula) en DMF (150 mL) se agitó durante 5 horas a 80°C. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió agua. El precipitado se retiró mediante filtración, y el filtrado se extrajo con cloroformo (3 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, filtraron y concentraron. El residuo se cristalizó con alcohol de isopropilo (70 mL), filtró y lavó con una mezcla de isopropanol/éter de diisopropilo 50/50 (10 mL). El residuo se secó durante la noche a 100°C produciendo el compuesto del título y se usó sin más purificación en la siguiente etapa.

Etapa B

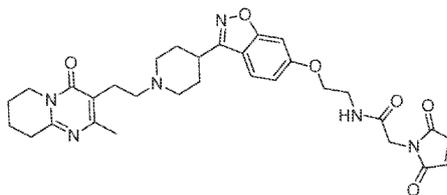
3-(2-(4-(6-(2-aminoetoxi)benzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno



Una solución de 3-(2-(4-(6-hidroxibenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno, preparada como se ha descrito en la etapa anterior, (6,6 g, 0,015 mmol) en DMF (50 mL) y acetona (50 mL) se trató con carbonato de potasio (3,0 g, 0,03 mmol) y etil(2-bromoetil)carbamato (2,4 g, 0,015 mmol). Después de agitar durante la noche a 60°C, la mezcla de la reacción se vertió en agua (150 mL), extrajo con cloroformo (3 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, filtraron, concentraron y purificaron mediante cromatografía de gel de sílice (elución con diclorometano/metanol (90/10)). Las fracciones combinadas se trataron con HBr (150 mL, 48%) y calentar a reflujo durante 30 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se hizo básica con hidróxido de amonio (28% NH₃ en H₂O) y se extrajo con cloroformo (3 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, filtraron, concentraron y purificaron mediante cromatografía de gel de sílice (elución gradiente con diclorometano/metanol (90/10 a 50/50) dando como resultado un sólido que se disolvió en isopropanol (50 mL) y trató con isopropanol/HCl. El precipitado se retiró mediante filtración y lavó con iPrOH/éter de diisopropilo (50/50, 3 x 20 ml). El precipitado se secó bajo vacío para producir el compuesto del título ESI-MS (M+1) 452. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,76 – 1,85 (m, 1 H) 1,87 – 1,96 (m, 1 H) 2,19 (d, J=12,81 Hz, 1 H) 2,37 – 2,48 (m, 4 H) 2,98 – 3,10 (m, 3H) 3,10 – 3,28 (m, 5 H) 3,37 – 3,46 (m, 3 H) 3,72 (d, J=11,34 Hz, 3H) 3,79 – 3,85 (m, 2 H) 4,31 (t, J=4,94 Hz, 1 H), 7,05 (dd, J=8,78, 1,83 Hz, 1 H) 7,35 – 7,39 (m, 1H), 8,08 (d, J=8,78 Hz, 1H).

Ejemplo 4

2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(2-((3-(1-(2-(2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida



A una solución de 3-(2-(4-(6-(2-aminoetoxi)benzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-uno, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 3, (3,4 mg, 7,58 μmoles) en 185 μL de DMF y 3,7 μL de tributilamina se añadieron 900 μL de una solución de DMF de N-(α-maleimidoacetoxi) succinimida éster (AMAS 10 mg/mL, 1,9 mg, 7,58 μmoles). La solución resultante se dejó agitando durante 90 minutos a 20°C, y después se usó como tal en reacción de conjugación con proteína activada con tiol.

Ejemplo 5

Conjugado 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(2-((3-(1-(2-(9-hidroxi-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida – hemocianina de lapa californiana

Etapa A

A una solución de 4,22 mL de hemocianina de lapa californiana (KLH, 18,0 mg, 0,18 μ moles) en 100 mM de búfer de amortiguador de fosfato, 0,46M cloruro de sodio, en pH 7,4, se añadieron 83,2 μ L de una solución DMF de N-succinimidil-S-acetiltoacetato (SATA, 25 mg/mL, 2,1 mg, 9,0 μ moles). La solución resultante se incubó a 20°C durante 1 hora en un mezclador rodillo. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100 mM amortiguador de fosfato, 0,46 M cloruro de sodio, 5 mM EDTA, en pH 6,0.

Etapa B

A 9,37 mL de solución KLH-SATA, preparada como se ha descrito en la Etapa A, (17,1 mg, 0,171 μ moles) se añadieron 937 μ L de 2,5 M hidroxilamina, 50 mM EDTA, en pH 7,0. La solución resultante se incubó a 20°C durante 40 minutos en un mezclador rodillo. La reacción se usó como tal en reacción de conjugación con hapteno activado con maleimida.

Etapa C

A una alícuota de la solución resultante de KLH-SH, preparada como se ha descrito en la Etapa A, (3,4 mL, 0,058 μ moles) se añadió una alícuota de solución de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-2-((3-(1-(2-(9-hidroxi-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 2, (282,8 μ L, 5,0 μ moles). La mezcla turbia resultante se filtró a través de un filtro jeringa de 0,2 μ M y después se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100 mM de amortiguador de fosfato, 0,46M cloruro de sodio, en pH 7,4.

Ejemplo 6

Conjugado 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-2-((3-(1-(2-(9-hidroxi-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida – tiroglobulina bovina

Etapa A

A 1,0 mL de una solución de tiroglobulina bovina (BTG, 9,3 mg, 0,014 μ moles) en 100 mM amortiguador de fosfato en pH 7,5 se añadieron 132 μ L de una solución DMF de N-succinimidil-S-acetiltoacetato (SATA, 25 mg/mL, 3,3 mg, 14,1 μ mole). La solución resultante se incubó a 20°C durante 1 horas en un mezclador rodillo. La reacción se purificó en un columna Sephadex G-25 usando 100 mM amortiguador de fosfato, 5 mM EDTA, en pH 6,0.

Etapa B

A 2,11 mL de solución BTG-SATA, preparada como se ha descrito en la Etapa A (7,4 mg, 0,011 μ moles) se añadieron 211 μ L de 2,5 M hidroxilamina, 50 mM EDTA, en pH 7,0. La solución resultante se incubó a 20°C durante 60 minutos en un mezclador rodillo. La reacción se usó como tal en reacción de conjugación con hapteno activado con maleimida.

Etapa C

A una alícuota de la solución resultante de BTG-SH como se ha descrito en la Etapa B, (2,3 mL, 0,011 μ moles) se añadió una alícuota de solución de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-2-((3-(1-(2-(9-hidroxi-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 2, (280,4 μ L, 5,5 μ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 2,5 horas a 20°C en un mezclador rodillo. La reacción se filtró a través de un filtro jeringa de 0,2 μ M y después se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100 mM de amortiguador de fosfato, 0,14M cloruro de sodio, en pH 7,4.

Ejemplo 7

Conjugado 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-2-((3-(1-(2-(2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida – hemocianina de lapa californiana

A una alícuota de solución KLH-SH, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 5 Etapa B, (1,5mL, 0,025 μ moles) se añadió una alícuota de solución de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-2-((3-(1-(2-(2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 4 (113 μ L, 2,26 μ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 2,5 horas a 20°C en un mezclador rodillo. La reacción se filtró a través de un filtro jeringa de 0,2 μ M y después se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100 mM de amortiguador de fosfato, 0,46M cloruro de sodio, en pH 7,4.

Ejemplo 8

Conjugado 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(2-((3-(1-(2-(2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida – tiroglobulina bovina

5 A una alícuota de solución BTG-SH, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 6 Etapa B, (0,63mL, 0,0033 μ moles) se añadió una alícuota de solución de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(2-((3-(1-(2-(2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il)etil)piperidin-4-il)benzo[d]isoxazol-6-il)oxi)etil)acetamida, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 4 (80 μ L, 1,6 μ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 10 2,5 horas a 20°C en un mezclador rodillo. La reacción se filtró a través de un filtro jeringa de 0,2 μ m y después se purificó en una columna Sephadex G-25 usando 100 mM de amortiguador de fosfato, 0,14M cloruro de sodio, en pH 7,4.

Ejemplo 9 – Inmunoensayo competitivo para Risperidona

15 Después de una serie de inmunizaciones con inmunógenos de risperidona, los sangrados de las colas de ratón se analizaron para reactividad usando un ELISA. Los sobrenadantes del hibridoma también se analizaron y los datos de ELISA mostrados en las Tablas 1 y 2 muestran reactividad de varios hibridomas (la pareja de fusión fue células NSO). Como se muestra en la Tabla 2, se vio la reactividad de hibridomas.

20 Tabla 1

Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Vacio Ag=Bt- Compuesto#1
400	1	5	14	39	41	47	58	62	67	72	76		
1200													
3600													
10800													
400	1	5	14	39	41	47	58	62	67	72	76		
1200													
3600													
10800													

35 Tabla 1 (continuación)

Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Ag=Bt- Comp#1
400	3.2562	3.2897	3.3148	3.6038	0.6857	3.3976	1.3444	2.8639	0.5676	3.5993	2.5144	0.0143	
1200	1.3591	1.4605	1.521	2.3063	0.1476	1.9245	0.2841	1.0387	0.1158	2.6921	0.8711	0.0142	
3600	0.3745	0.4617	0.3733	0.7613	0.038	0.6163	0.0689	0.2742	0.0304	0.9549	0.2236	0.0115	
10800	0.0918	0.1149	0.0908	0.1919	0.0156	0.1834	0.0199	0.0639	0.013	0.2766	0.056	0.0099	

Tabla 1 (continuación)

Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Ag=Bt- Comp#1
400	3.1217	3.1103	3.1532	3.633	0.6089	3.5705	1.1067	2.4001	0.4963	3.4172	2.2432	0.0095	
1200	1.2607	1.4817	1.3412	2.1411	0.1327	1.9831	0.2691	0.961	0.1027	2.5321	0.7418	0.0098	
3600	0.3281	0.4159	0.3819	0.7373	0.0361	0.593	0.0723	0.292	0.0284	0.8426	0.2024	0.0079	
10800	0.0879	0.1127	0.0929	0.1949	0.0156	0.189	0.0229	0.0722	0.0141	0.2393	0.052	0.0086	

40

45

Tabla 2

	Placa 1		
Dilución	1	2	3
neto	En blanco	1C4	6E6
neto		2A5	7A7
neto		2G10	Vacío
neto		3B7	
neto		4D8	
neto		5A12	
neto		5G11	
neto		6C1	
Dilución	1	2	3
neto	0,0072	0,038	0,0309
neto	0,0077	3,9563	0,1163
neto	0,0069	0,0093	0,0086
neto	0,0076	0,0753	0,0108
neto	0,0114	0,1139	0,0084
neto	0,009	0,0193	0,0123
neto	0,0087	0,2503	0,0085
neto	0,0092	0,086	0,121

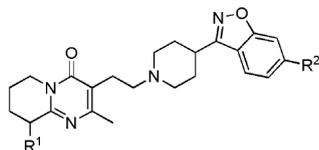
Después de identificar los clones mediante reactividad ELISA, los ELISAs de competición se activaron para aproximarse a la afinidad y reactividad cruzada con compuestos similares. Las Figs. 1 y 2 muestran los resultados de reactividad cruzada ELISA de subclon 5_9 de hibridoma. Los datos muestran reactividad con risperidona, así como sus metabolitos papliperidona y 7-hidroxirisperidona.

Los sobrenadantes también se analizaron mediante ELISA de competición para determinar si las señales eran específicas para risperidona o paliperidona. La Fig. 3 muestra los resultados de subclon 2A5 de hibridoma. Los datos muestran reactividad para risperidona y paliperidona. La Fig. 4 muestra el formato de inmunoensayo competitivo usado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral donde el anticuerpo de captura, risperidona clon 5-9, se depositó en un chip junto con un conjugado de detección que consiste en risperidona conjugado con un fluoróforo. En este formato competitivo como el mostrado en la Fig. 4, un nivel bajo de analito (risperidona) da como resultado una señal alta, mientras que un nivel alto de analito (risperidona) da como resultado una señal baja. La cantidad de risperidona en la muestra puede calcularse a partir de la pérdida de fluorescencia en comparación con una muestra de control sin fármaco presente. Una curva de respuesta de dosis típica generada con risperidona clon 5-9 se muestra en la Fig. 5.

Reivindicaciones

1. El compuesto de la Fórmula I

5



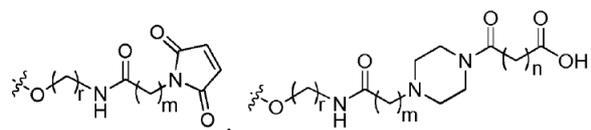
10

Fórmula 1

donde:

15

R¹ es H, u OH;
R² es O(CH₂)_rNH₂,



20

O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
donde:

25

Z se selecciona del grupo consistente en:

-N(R⁴)-, -O-, -S-, -heteroalquilo-;

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

Y es un grupo separador orgánico;

30

G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;

p es 0 o 1;

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

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

n es 1, 2, 3, 4 o 5.

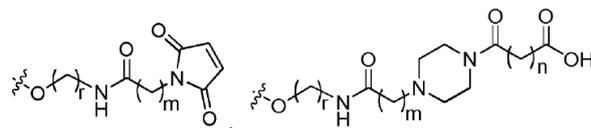
35

2. El compuesto de la Reivindicación 1

donde:

40

R¹ es H, u OH;
R² es O(CH₂)_rNH₂,



45

O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
donde:

50

Z es O;

Y es un grupo separador orgánico;

G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;

p es 0 o 1;

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

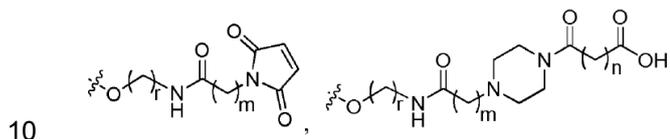
55

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

n es 1, 2, 3, 4 o 5.

5 **3.** El compuesto de la Reivindicación 1 donde:

R¹ es H, u OH;
R² es O(CH₂)_rNH₂,



O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H, o Z-(Y)_p-G;
donde:

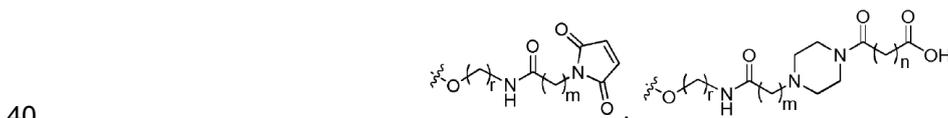
15 Z es O(CH₂)_rNH;
Y es un grupo separador orgánico;
G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un transportador;
p es 0 o 1;
20 r es 1, 2, 3, 4 o 5;
m es 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

25 **4.** El compuesto de la Reivindicación 3 donde:

p es 1;
r es 2;
m es 1, 2, 3, 4 o 5; y
30 n es 1, 2, 3, 4 o 5.

5. El compuesto de la Reivindicación 3 donde:

35 R¹ es H, u OH;
R² es O(CH₂)_rNH₂,

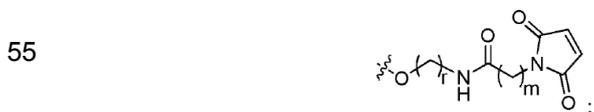


O(CH₂)_rNHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
donde:

45 r es 2;
m es 1, 2, 3 o 4;
n es 1 o 2.

50 **6.** El compuesto de la Reivindicación 5, donde:

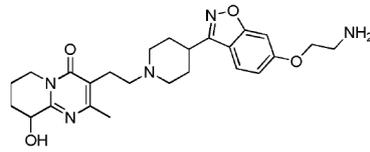
R¹ es H, u OH; y
R² es O(CH₂)_rNH₂, o



60 r es 2; y
m es 1.

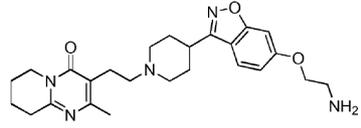
7. El compuesto de la Reivindicación 1, seleccionado del grupo consistente en:

5



;

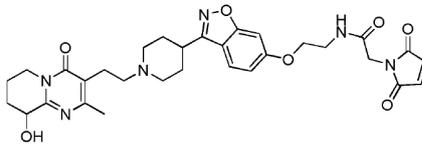
10



;

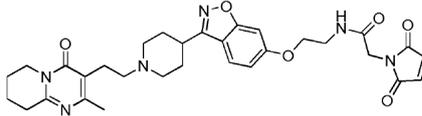
15

20



;

25



y

30

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

9. El conjugado de la Reivindicación 8, donde dicho transportador inmunogénico es una proteína.

35

10. El conjugado de la Reivindicación 9, donde dicha proteína es hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina o tiroglobulina bovina.

11. Un conjugado del compuesto de la Reivindicación 2 y un transportador inmunogénico.

40

12. Un conjugado del compuesto de la Reivindicación 3 y un transportador inmunogénico.

13. Un conjugado del compuesto de la Reivindicación 4 y un transportador inmunogénico.

45

14. Un conjugado del compuesto de la Reivindicación 5 y un transportador inmunogénico.

15. Un conjugado del compuesto de la Reivindicación 6 y un transportador inmunogénico.

16. Un conjugado de la Reivindicación 8 donde el compuesto es

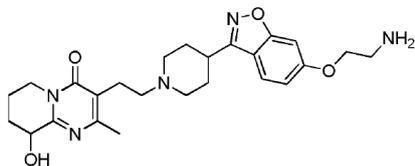
50

55

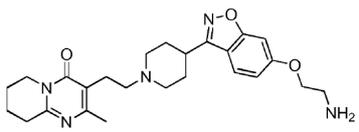
60

65

5

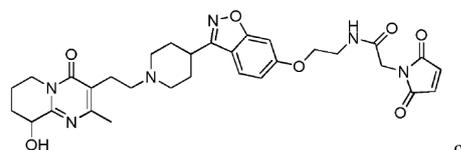


10

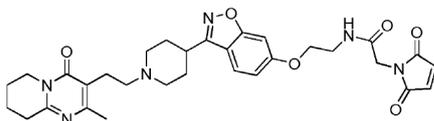


15

20



25



30

17. El conjugado de la Reivindicación 16, donde dicho transportador inmunogénico es una proteína.

18. El conjugado de la Reivindicación 17, donde dicha proteína es hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina o tiroglobulina bovina.

35

19. El conjugado de la reivindicación 8 hecho mediante el proceso de contactar un compuesto de la Reivindicación 1 con un transportador inmunogénico.

20. El conjugado de la reivindicación 11 hecho mediante el proceso de contactar un compuesto de la Reivindicación 2 con un transportador inmunogénico.

40

21. El conjugado de la reivindicación 12 hecho mediante el proceso de contactar el compuesto de la Reivindicación 3 con un transportador inmunogénico.

45

22. El conjugado de la reivindicación 13 hecho mediante el proceso de contactar el compuesto de la Reivindicación 4 con un transportador inmunogénico.

23. El conjugado de la reivindicación 14 hecho mediante el proceso de contactar el compuesto de la Reivindicación 5 con un transportador inmunogénico.

50

24. El conjugado de la reivindicación 15 hecho mediante el proceso de contactar el compuesto de la Reivindicación 6 con un transportador inmunogénico.

25. El conjugado de la Reivindicación 18 donde el transportador inmunogénico es una proteína.

55

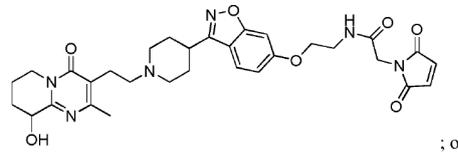
26. El conjugado de la Reivindicación 25 donde la proteína es hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina o tiroglobulina bovina.

27. El conjugado de la reivindicación 19 donde el compuesto es

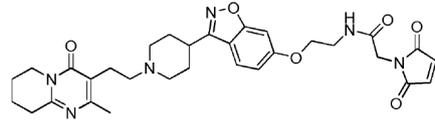
60

65

5



10



15

28. El conjugado de la Reivindicación 27 donde el transportador inmunogénico es una proteína.

29. El conjugado de la Reivindicación 28 donde la proteína es hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina o tiroglobulina bovina.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

Competición CTI Ratón 2.2 subclon 5_9

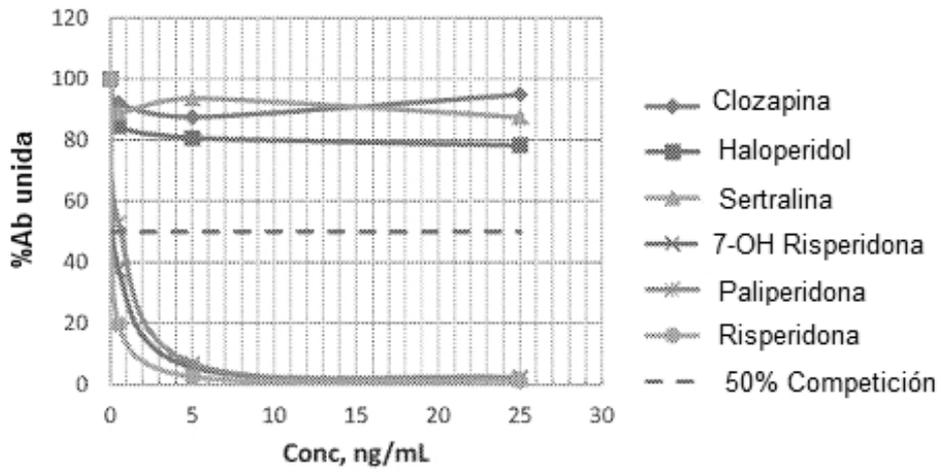


Fig. 2

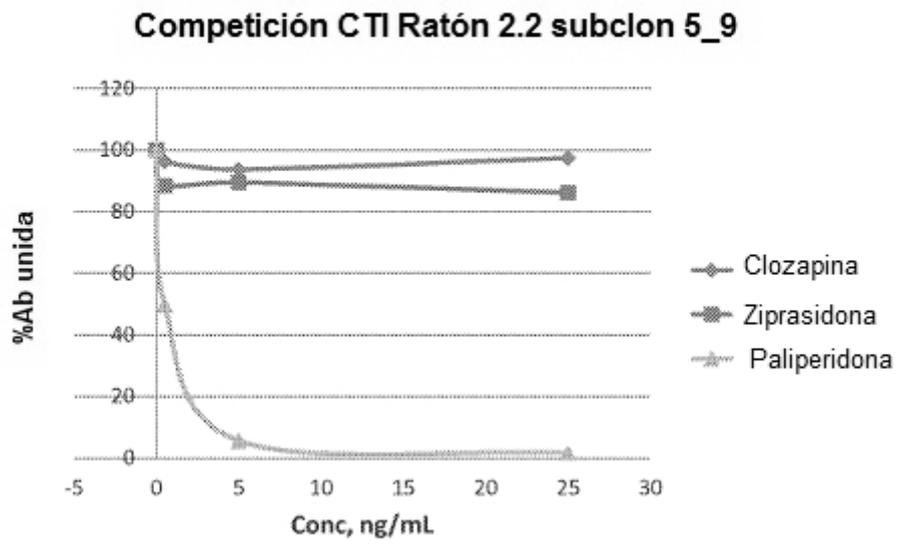


Fig. 3

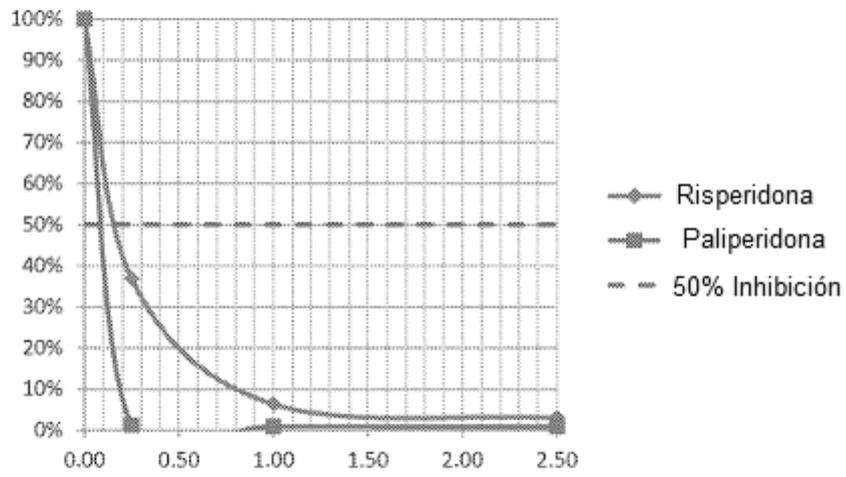


Fig. 4

Formatos competitivos: Ab debajo

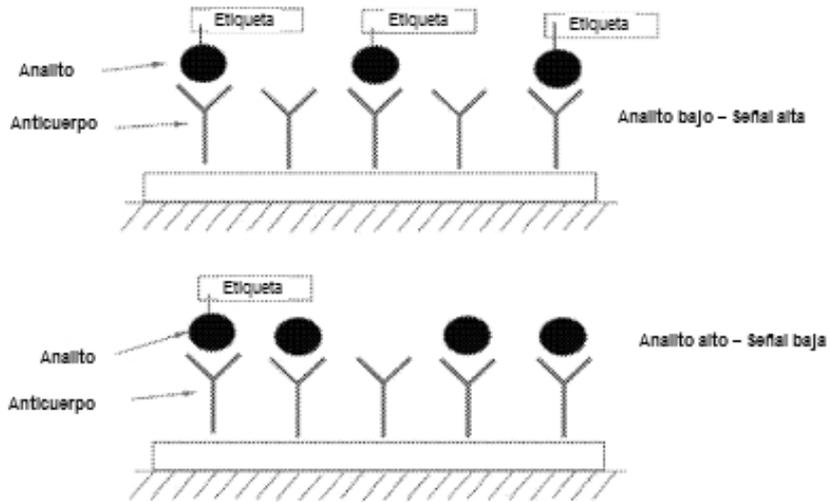


Fig. 5

