(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 674 704**

(51) Int. CI.:

C07D 249/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2014 PCT/US2014/015601**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14126861**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2014 E 14751352 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2956444**

(54) Título: **Inmunoensayos de posaconazol**

(30) Prioridad:

13.02.2013 US 201361764353 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2018

(73) Titular/es:

ARK DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
48089 Fremont Boulevard
Fremont, CA 94538, US

(72) Inventor/es:

VALDEZ, JOHNNY;
OH, SOON J. y
MOON, BYUNG SOOK

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

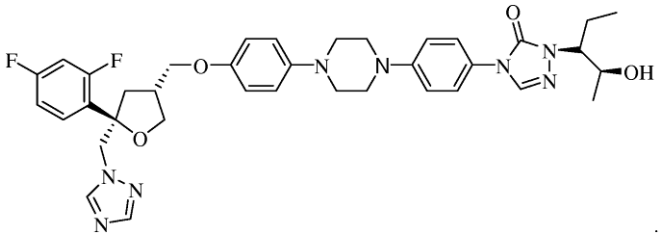
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayos de posaconazol

Introducción

El posaconazol es un agente antifúngico triazólico. Posaconazol se designa químicamente como 4-[4-[4-[4-[[(3R, 5R)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidro-5-(1H1,2,4-triazol-1-ilmetil)-3-furanil]metoxi]fenil]-1-piperazinil]fenil]-2-[(1S,2S)-1-etil-2-hidroxi propil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona con una fórmula empírica de $C_{37}H_{42}F_2N_8O_4$ y un peso molecular de 700.8. La fórmula estructural es:



Las infecciones fúngicas invasivas están asociadas con una alta morbilidad y mortalidad. La incidencia de enfermedades fúngicas invasivas (IFD) se ha incrementado paralelamente con el aumento de las poblaciones inmunocomprometidas en riesgo, tales como los pacientes sometidos a trasplante de órganos sólidos y médula ósea, los que reciben quimioterapia y/o inmunosupresión a largo plazo y los que tienen una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.

El posaconazol está aprobado para el tratamiento de la candidiasis orofaríngea y para la profilaxis contra las infecciones por Aspergillus y Candida en pacientes gravemente inmunodeprimidos. Sin embargo, el posaconazol tiene una biodisponibilidad baja y altamente variable debido a la absorción oral saturable, que está influenciada por una disolución pobre y pH intestinal, lo que resulta en una exposición desproporcionadamente mayor cuando se administra en dosis divididas [Li et al., Clin. Pharmacokinet, 49: 379-396]. Se ha demostrado que la administración concomitante con alimentos aumenta la biodisponibilidad de posaconazol hasta 4 veces [Krishna, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 53: 958-966]; por el contrario, se ha demostrado que medicamentos tales como los inhibidores de la bomba de protones disminuyen significativamente la exposición al posaconazol debido al aumento del pH gástrico [Walravens J, et al., Clin. Pharmacokinet. 50: 725-734]. Las concentraciones bajas de posaconazol se han informado comúnmente en la práctica clínica [Bryant et. al., Int. J. Antimicrob. Agents 37: 266-269; Eiden C, et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infectar. Dis. 31: 161 - 167; Lebeaux D, et al., Antimicrob. Agentes Chemother. 53: 5224-5229; Neubauer WC, et al., Antimicrob. Agentes Chemother. 54: 4029-4032; Shields RK, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 55: 1308-1311; Thompson GR, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 53: 2223 - 2224].

Un análisis farmacocinético-farmacodinámico de los datos de los pacientes reveló una aparente asociación entre las concentraciones promedio de posaconazol (C_{av}) y eficacia profiláctica [Merck & Co. 2010, Noxafil US prescribing information, revisada en 2012]. El manejo terapéutico de medicamentos (TDM) y la individualización de la terapia es una forma de maximizar los resultados de pacientes inmunodeprimidos vulnerables. Con el TDM, las dosificaciones de fármacos podrían individualizarse para el paciente, y las posibilidades de tratar eficazmente las infecciones fúngicas pueden ser mucho mayores. Se ha demostrado que las concentraciones subterapéuticas de posaconazol son comunes y se asocian con resultados clínicos pobres. Como tal, el TDM puede facilitar la exposición eficaz a posaconazol [Dolton MJ, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 56: 5503-5510].

El TDM de rutina de posaconazol se puede facilitar mediante el uso de pruebas automatizadas simples adaptables a equipos de laboratorio generales, tales como inmunoensayos. Actualmente no hay inmunoensayos disponibles para determinar los niveles de posaconazol en plasma o sangre. Como tal, existe una necesidad en la técnica de inmunoensayos para la medición de rutina de posaconazol en fluidos biológicos humanos de pacientes tratados con posaconazol.

Sharma V. et al., ("Trizaoles in Antifungal Therapy: A Review", International Journal of Research in Phamaceutical and Biomedical Science, vol. 2, No. 2, 1 de junio de 2011, páginas 417-427) es una revisión de triazoles en terapia antifúngica y busca proporcionar medicamentos antifúngicos actualmente disponibles para las infecciones por hongos.

Couchman L. et. Al., ("An automated method for the simultaneous measurement of azole antifungal drugs in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry", Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer, Berlin, DE, vol. 404, no. 2, 14 de junio de 2012, páginas 513-523) describe un método para la medición simultánea de fármacos antifúngicos azólicos en plasma o suero humano usando cromatografía líquida de flujo turbulento - espectrometría de masas en tándem que se puede usar en el control de fármacos terapéuticos.

Manclus J.J. et al. ("Development of Monoclonal Immunoassays for the Determination of Triazole Fungicides in Fruit Juices", Journal of Agricultural and Food Chemistry, volumen 56, Nº 19, 8 de octubre de 2008, páginas 8793-8800) describe inmunoensayos que pueden determinar los fungicidas triazólicos en los zumos fruta sin otro tratamiento de muestra diferente de la dilución.

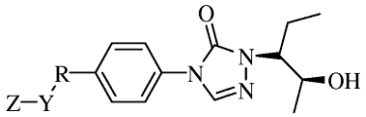
Chen T. et al., ("Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for a Broad Spectrum Triazole Fungicide: Hexaconazole", Journal of Agricultural and Food Chemistry, col 44, No. 5, 1 de enero de 1996, páginas 1352-1356) describe un ensayo que permite la concentración de hexaconazol en un fungicida comercial que se va a determinar.

Resumen

Se describen métodos, composiciones y kits dirigidos a fragmentos de posaconazol, inmunógenos, fracciones que generan señal, anticuerpos que se unen a posaconazol e inmunoensayos para la detección de posaconazol.

Las realizaciones proporcionan la detección de posaconazol en una muestra. En esta determinación, son útiles una variedad de haptenos, conjugados de compañeros reactivos de hapteno, derivados de hapteno, receptores, métodos y kits.

Las realizaciones de la presente divulgación incluyen un compuesto de fórmula 1:



en el que

R es CH_2, NH, NHCO, S u O;
Y es un grupo de enlace seleccionado del grupo que consiste en-$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$- -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-NHC(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-NHC(O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$SCH$_2$C(O)-,-$(CH_2)_n$-C(O)NH-$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$-NHC(O)-,-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-$(CH_2)_n$-, -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)O-, y -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)NH-, en donde n es un número entero de 1 a 10; y

Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -OH, -SH, -S-acilo, -O-(alquilo C_{1-8}), halógeno, -NH_2, epoxi, maleimidilo, haloacetamida, carboxilo, carboxilo activado, un transportador inmunogénico, y un marcador, y
sales de los mismos.

El grupo de enlace puede incluir 1-15 átomos de carbono y/o 0-6 heteroátomos. En algunas realizaciones, el grupo de enlace se selecciona del grupo que consiste en-$(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-, -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-NHC(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-NHC(O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$SCH$_2$C(O)-,-$(CH_2)_n$-C(O)NH-$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-,-$(CH_2)_n$-NHC(O)-$(CH_2)_n$-, -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)O-, y -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)NH-, donde n es un número entero de 1 a 10, y que incluye sus sales. En algunas realizaciones, el transportador inmunogénico es una proteína. En algunas realizaciones, la proteína se selecciona del grupo que consiste en hemocianinas, globulinas y albúminas. En algunas realizaciones, la proteína es albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH).

En algunas realizaciones, el transportador inmunogénico es un polisacárido. En algunas realizaciones, el marcador es una enzima. En algunas realizaciones, la enzima se selecciona del grupo que consiste en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa y peroxidasa de rábano picante. En algunas realizaciones, la enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). En algunas realizaciones, el grupo carboxilo activado incluye un grupo seleccionado del grupo que consiste en hidroxisuccinimidilo, succinimidilo, carbonato, anhídrido e imidato.

Los aspectos de la presente divulgación incluyen un método para detectar posaconazol. El método incluye combinar en una mezcla de reacción una muestra que se sospecha que contiene posaconazol con un anticuerpo que se une a posaconazol o un conjugado marcador que comprende un compuesto de fórmula 1, en donde Z es dicho marcador. El método incluye además detectar la presencia o ausencia de un complejo de posaconazol y el anticuerpo, donde la detección comprende determinar la presencia de un producto de reacción enzimático del conjugado marcador, donde la presencia del complejo indica la presencia de posaconazol en la muestra. En algunas realizaciones, la detección incluye comparar una señal detectable generada por el conjugado marcador con una muestra de referencia.

Los aspectos de la presente divulgación incluyen un anticuerpo aislado que se une a un epítopo presente en posaconazol y presente en un compuesto de fórmula 1. En algunas realizaciones, el anticuerpo es una composición de anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una reactividad cruzada con fluconazol, itraconazol y voriconazol de 1,5% o menos cada uno con respecto a la unión a posaconazol.

Los aspectos de la presente divulgación incluyen un kit para detectar posaconazol en una muestra. El kit incluye: (a) un

anticuerpo aislado que se une a un epítopo presente en posaconazol y presente en un compuesto de fórmula 1; y (b) instrucciones para un ensayo para detectar posaconazol. En algunas realizaciones, el kit incluye reactivos auxiliares para detectar un complejo del anticuerpo y posaconazol. En algunas realizaciones, el kit incluye además un conjugado marcado de un compuesto de fórmula 1. El anticuerpo del kit puede ser un anticuerpo producido contra un compuesto de fórmula 1 anterior. En algunas realizaciones, el anticuerpo es una composición de anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Breve divulgación de los dibujos

La Fig. 1 muestra estructuras químicas para el posaconazol (1) y el fragmento de posaconazol (2), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

La Fig. 2 muestra estructuras químicas para los fármacos antifúngicos triazólicos: Fluconazol (3), Itraconazol (4) y Voriconazol (5).

La Fig. 3 muestra un esquema sintético para la síntesis del hapteno del fragmento de posaconazol (POS-IV), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

La Fig. 4 muestra un esquema sintético para la síntesis de un inmunógeno de hemocianina de lapa californiana (KLH) POS-IV KLH y un conjugado de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) POS-IV G6PDH de un hapteno del fragmento de posaconazol del éster de N-hidroxi succinimida (NHS) (POS-IV), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

La Fig. 5 (Paneles (a) y (b)) son diagramas de flujo que ilustran las realizaciones de un método para realizar un ensayo de inmunodiagnóstico para posaconazol, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La tasa de absorbancia creciente a 340 nm debido a la conversión de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido reducido) a NADH (nicotinamida adenina dinucleótido oxidado) está relacionada con la concentración de posaconazol en la muestra mediante una función matemática. La reacción enzimática es catalizada por el conjugado posaconazol-enzima.

La Fig. 6 muestra una curva de calibración para un inmunoensayo homogéneo competitivo para posaconazol en una matriz calibradora de suero humano combinado, de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación.

La Fig. 7 muestra un espectro de RMN ^1H de hapteno POS-IV, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

La Fig. 8 muestra una curva de calibración para un inmunoensayo homogéneo competitivo para posaconazol en una matriz calibradora de suero humano combinado, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que se refiere la presente divulgación. Los siguientes términos se definen para los efectos de la presente divulgación.

Analito

Un analito es el compuesto o composición a medir, el material de interés, tal como posaconazol. En ciertas realizaciones, el analito es un miembro de un par de unión específico (sbp) y puede ser un ligando, que es mono o polivalente, puede ser antigénico o hapténico, y es un compuesto único o una pluralidad de compuestos que comparten al menos uno sitio epitópico o determinante común.

Muestra sospechosa de contener analito

Se puede analizar cualquier muestra que razonablemente se sospeche que contiene analito por los métodos de la presente divulgación. Tales muestras pueden incluir muestras humanas, animales o artificiales. La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente que no interfiera con el ensayo. La muestra puede ser una solución acuosa o un fluido natural, tal como, orina, sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo o saliva. En algunas realizaciones, la muestra es suero.

Medición de la cantidad de analito

Los métodos cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos para determinar el analito se consideran métodos para medir la cantidad de analito. Por ejemplo, se considera que un método cualitativo que simplemente detecta la presencia o ausencia de analito en una muestra que se sospecha que contiene un analito está incluido dentro del alcance de las realizaciones. Los sinónimos de la frase "medir la cantidad de analito" que se contemplan dentro del alcance de las realizaciones incluyen, pero no se limitan a, detectar, medir o determinar el analito; detectar, medir o determinar la presencia de analito; y detectar, o determinar la cantidad de analito.

Suero humano

"Suero humano", como se usa en el presente documento, se refiere a la porción acuosa de sangre humana que queda después de que se haya eliminado la fibrina y el material suspendido (tal como células).

Inmunoensayo

Como se usa en este documento, los términos "inmunoensayo" o "inmunodiagnóstico" se refieren a técnicas de laboratorio o sistemas de prueba que hacen uso de la unión entre un antígeno o analito y un anticuerpo con el fin de identificar y/o cuantificar al menos uno de entre el antígeno o analito específico o anticuerpo específico en una muestra biológica.

Como se usa en la presente memoria, el término "inmunoensayo competitivo" se refiere a un protocolo experimental en el que una cantidad conocida de un antígeno o analito identificable compite con otro antígeno o analito por la unión con un anticuerpo. Es decir, un antígeno o analito conocido que se une con un anticuerpo conocido se combina con una muestra que se sospecha que contiene otro antígeno o analito que también se une con el anticuerpo conocido. Esto permite que el antígeno o analito conocido y otro antígeno o analito compitan por el sitio de unión del anticuerpo. Por ejemplo, un fragmento de posaconazol que se une con un anticuerpo anti-posaconazol se puede combinar con una muestra sospechosa de contener posaconazol, y el fragmento de posaconazol y el posaconazol compiten por la unión con el anticuerpo anti-posaconazol. La competencia por la unión con el anticuerpo se puede usar para determinar si el posaconazol está o no presente en la muestra y se puede usar para cuantificar la cantidad de posaconazol en la muestra.

Miembro de un par de enlace específico

Un miembro de un par de unión específico (miembro de sbp) es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en la superficie o en una cavidad que se une específicamente y se define como complementaria con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específico se denominan ligando y receptor (antiligando), miembro de sbp y socio de sbp, o similares. En algunas realizaciones, los miembros de un par de unión específico son miembros de un par inmunológico, tal como antígeno-anticuerpo.

Ligando

Un ligando es un compuesto orgánico para el cual existe un receptor o puede prepararse de forma natural. Por ejemplo, el analito puede ser un ligando y las realizaciones de la presente divulgación proporcionan métodos para determinar la concentración del ligando.

Receptor

Un receptor es un compuesto o composición capaz de reconocer una organización espacial y polar particular de una molécula. Estas áreas organizadas de una molécula se conocen como sitios epitópicos o determinantes. Por ejemplo, los receptores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y enzimas.

Grupo de enlace

El término "enlazador" o "grupo de enlace" se refiere a una porción de una estructura química que conecta dos o más subestructuras. Un grupo de enlace tiene al menos una cadena ininterrumpida de átomos que se extiende entre las subestructuras. Los átomos de un grupo de enlace están ellos mismos conectados por enlaces químicos. El número de átomos en un grupo de enlace se determina contando los átomos distintos de hidrógeno. Los grupos de enlace pueden incluir, pero sin limitación, grupos tales como alquileno, heteroalquileno, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, amino, como se describe en este documento.

Conjugado

Un conjugado es una molécula que incluye dos o más subestructuras unidas entre sí, opcionalmente a través de un grupo de enlace, para formar una única estructura. La unión se puede realizar mediante una conexión directa (por ejemplo, un enlace químico) entre las subunidades o mediante el uso de un grupo de enlace. Por ejemplo, un conjugado puede incluir una enzima G6PDH o una proteína marcadora que incluye fosfatasa alcalina, β-galactosidasa y peroxidasa de rábano picante o un marcador químico tal como una molécula fluorescente, luminiscente o colorimétrica o micropartícula unida a un hapteno (por ejemplo, Posaconazol, posaconazol fragmento, etc.), miembro de sbp o análogo de analito.

Conjugación

La conjugación es cualquier proceso en el que dos subunidades están unidas entre sí para formar un conjugado. El proceso de conjugación puede incluir una o más etapas.

Fragmento

Como se usa en este documento, un "fragmento" es una porción incompleta o aislada de un compuesto derivado u obtenido de otro (por ejemplo, un compuesto original) o por síntesis total, que es la síntesis orgánica completa de un compuesto orgánico complejo, generalmente sin la ayuda de procesos biológicos y que contienen elementos del compuesto original. De este modo, en algunas realizaciones, el término fragmento se refiere a un compuesto químico o molécula que contiene una porción del compuesto original (por ejemplo, posaconazol) producido por una o más reacciones químicas. Como tal, un fragmento puede ser un compuesto con una estructura que incluye una porción del compuesto original o derivado del mismo. En ciertas realizaciones, el fragmento también representa la estructura química que, cuando se conjuga con una proteína transportadora, es el objetivo para la producción y unión de anticuerpos.

Fragmento de posaconazol

Un "fragmento de posaconazol" como se usa en esta divulgación se refiere a un compuesto con una estructura que incluye una porción de posaconazol o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, un fragmento de posaconazol compite con posaconazol por la unión a un compañero de unión anti-posaconazol, tal como un anticuerpo anti-posaconazol.

Ciertos compuestos descritos en este documento en relación con las realizaciones pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, que incluyen formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a formas no solvatadas y están abarcadas dentro de la referencia a los compuestos expuestos en la presente divulgación. Ciertos compuestos divulgados en este documento en conexión con las realizaciones pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas.

Hapteno

Los haptenos son capaces de unirse específicamente a los anticuerpos correspondientes, pero habitualmente no actúan ellos mismos como inmunógenos para la preparación de los anticuerpos. Los anticuerpos que reconocen un hapteno se pueden preparar contra compuestos que incluyen el hapteno unido a un transportador inmunogénico.

Anticuerpo

El término "anticuerpo anti-posaconazol" se refiere a anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a un epítopo de posaconazol de posaconazol, un fragmento de posaconazol o un conjugado de posaconazol. "Anticuerpos anti-posaconazol" incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos tal como se definen en la presente memoria. Un "epítopo de posaconazol" se refiere a un epítopo que está presente en posaconazol y en un fragmento de posaconazol (por ejemplo, un conjugado de posaconazol). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-posaconazol es un anticuerpo de origen no natural. Por ejemplo, el anticuerpo anti-posaconazol se puede producir usando un inmunógeno (por ejemplo, un conjugado de posaconazol inmunogénico) de la presente divulgación.

El término "se une específicamente" o "específicamente se une" en el contexto de la unión del anticuerpo, se refiere a una alta avidez y/o unión de alta afinidad de un anticuerpo a un antígeno específico, por ejemplo, a posaconazol. En la unión específica en condiciones apropiadas, la unión del anticuerpo a posaconazol es más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a cualquier otro epítopo, particularmente aquellos que pueden estar presentes en moléculas asociadas con, o en la misma muestra, que el posaconazol a detectar, por ejemplo, se une con mayor fuerza (por ejemplo, mayor afinidad, mayor avidez o ambos) a posaconazol que a un epítopo sin posaconazol, de modo que mediante el ajuste de las condiciones de unión el anticuerpo se une casi exclusivamente a posaconazol o una fracción de posaconazol como la presente en un compuesto de la presente divulgación, y no a fracciones sin posaconazol que pueden estar presentes en la muestra. Los anticuerpos que se unen específicamente a posaconazol pueden ser capaces de unirse a otros antígenos a un nivel débil, pero detectable (por ejemplo, 10% o menos de la unión que se muestra a posaconazol). Dicha unión débil, o unión de fondo, es fácilmente discernible a partir del anticuerpo específico que se une a posaconazol, por ejemplo, mediante el uso de controles apropiados. "Actividad de anticuerpo" o "actividad de unión de anticuerpo" en el contexto de ensayos de unión de analito generalmente se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unir un antígeno o analito específico con preferencia a otros antígenos o analitos potenciales a través del sitio de combinación del antígeno ubicado dentro de una región variable de una inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" incluye una molécula de proteína que tiene uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por todos o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo, en humanos, incluyen los loci genéticos de cadena kappa (κ), lambda (λ) y pesada, que juntos comprenden la miríada de genes de la región variable, y los genes de la región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), épsilon (ε) y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG, IgE e IgA, respectivamente. "Anticuerpo" como se usa en la presente memoria incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos, y puede referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un anticuerpo generado en forma recombinante para fines experimentales, terapéuticos u otros, como se define más adelante. Por lo tanto, el término

"anticuerpo producido contra un compuesto" incluye un anticuerpo o compuesto sintetizado que tiene la misma estructura que un anticuerpo producido contra el compuesto. El término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpos, como se conocen en la técnica, tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno, ya sea producidos por la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados nuevamente utilizando tecnologías de ADN recombinante. El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos monoclonales y policlonales. Los anticuerpos pueden ser antagonistas, agonistas, neutralizantes, inhibidores o estimuladores.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo policlonal" se refiere a una mezcla heterogénea de anticuerpos con un amplio intervalo de especificidades y afinidades por un antígeno o epítopo dado. Por lo tanto, el anticuerpo policlonal, que también se puede denominar anticuerpos policlonales, puede incluir una pluralidad de anticuerpos, cada uno distinguible de los otros, que se unen o interactúan de otro modo con un antígeno. El término "policlonal" se refiere a anticuerpos que se originan en múltiples células progenitoras. Los diferentes anticuerpos que comprenden un anticuerpo policlonal pueden producirse o generarse inyectando un inmunógeno que tiene un epítopo en un animal y, después de un tiempo apropiado, recoger y opcionalmente purificar la fracción de sangre que contiene los anticuerpos de interés. Al producir anticuerpos, se pueden considerar varios parámetros con respecto al uso final para el anticuerpo policlonal. Estos parámetros incluyen lo siguiente: (1) la especificidad del anticuerpo (es decir, la capacidad de distinguir entre antígenos); (2) la avidez del anticuerpo (es decir, la fuerza de unión de un epítopo); y (3) el título del anticuerpo, que determina la dilución óptima del anticuerpo en el sistema de ensayo.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se aísla de un cultivo de células productoras de anticuerpos normales y una única célula progenitora. Un anticuerpo monoclonal puede tener una constante de unión homogénea. Los anticuerpos monoclonales incluyen un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos empalmando un dominio variable (incluido hipervariable) de un anticuerpo anti-inhibidor con un dominio constante, o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de la especie de origen o la designación de clase o subclase de inmunoglobulina, así como fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, Fab, $F(ab)_2$ y Fv1, que exhiben la actividad biológica deseada. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler & Milstein, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty et al., Nature, 348: 552-554 (1990).

Antígeno

"Antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que se une específicamente a la región variable o sitio de unión de un anticuerpo. El término "antígeno" e "inmunógeno" puede usarse en algunos casos indistintamente.

Epítopo

El término "epítopo" se refiere a una región de un antígeno que interactúa con una molécula de anticuerpo. Una molécula antigénica puede tener uno o más epítopos que pueden ser reconocidos por el mismo o diferentes anticuerpos. Un epítopo o fracción epitópica puede comprender una configuración química única de un antígeno, hapteno o ligando reactivo. La configuración química puede ser una secuencia lineal de composición química o incluso un arreglo espacial de grupos químicos en la configuración química. Un epítopo es la configuración química que se asocia directamente con el sitio de unión en la molécula de anticuerpo. El anticuerpo y el grupo químico, el hapteno o el ligando de reacción que contiene el epítopo forman el "par de unión específica".

Inmunógeno

Como se usa en el presente documento, los términos "inmunógeno" e "inmunogénico" se refieren a sustancias capaces de producir o generar una respuesta inmune (por ejemplo, respuesta de anticuerpos) en un organismo. Un inmunógeno también puede ser antígeno. En algunas realizaciones, el inmunógeno tiene un alto peso molecular (por ejemplo, mayor a 10.000). Por lo tanto, una variedad de macromoléculas tales como proteínas, lipoproteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y ácidos teicóicos se pueden acoplar a un hapteno para formar un inmunógeno de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación. Los inmunógenos de la presente divulgación se pueden usar para producir anticuerpos que no se producen de manera natural.

Como se usa en este documento, el término "inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una molécula para inducir

una respuesta inmune, que está determinada tanto por la estructura química intrínseca de la molécula como por si el animal huésped puede o no reconocer el compuesto. Pequeños cambios en la estructura de un antígeno pueden alterar en gran medida la inmunogenicidad de un compuesto y se han usado ampliamente como un procedimiento general para aumentar las posibilidades de generar un anticuerpo, particularmente contra antígenos bien conservados. Por ejemplo, estas técnicas de modificación pueden alterar regiones del inmunógeno para proporcionar sitios mejores para la unión de células T o exponer nuevos epítopos para la unión de células B.

Portador inmunogénico

"Portador inmunogénico", "transportador" o "fracción inmunogénica", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material que cuando se combina con un hapteno estimula una respuesta inmune *in vitro* o *in vivo*. Un hapteno se convierte en una fracción inmunogénica cuando se acopla a un transportador y una parte del inmunógeno puede inducir una respuesta inmune y provocar la producción de anticuerpos que se pueden unir específicamente con el hapteno. Las fracciones portadoras inmunogénicas incluyen proteínas, péptidos (incluyendo polipéptidos), glicoproteínas, sacáridos que incluyen polisacáridos complejos, partículas, ácidos nucleicos, polinucleótidos y similares que se reconocen como extraños y de ese modo provocan una respuesta inmunológica del huésped.

Anticuerpo inhibidor

Un anticuerpo inhibidor es un anticuerpo capaz de inhibir la actividad de una enzima o un conjugado de enzima-ligando al unirse un epítopo presente en la enzima. Los anticuerpos inhibidores se distinguen de los anticuerpos anti-ligando capaces de inhibir la actividad enzimática de los conjugados enzima-ligando al unirse al ligando.

Precisión

El término "precisión" se refiere a la cercanía del acuerdo entre el resultado de un mensurando y un valor verdadero del mensurando. El mensurando es la sustancia medida o analizada, tal como el analito o el ligando que entra en la reacción de unión con el receptor o el anticuerpo.

Especificidad

El término "especificidad" o "selectividad" se refiere a la unión preferencial de un ligando a un receptor (por ejemplo, un anticuerpo). Por lo tanto, la especificidad puede referirse, en una realización, al grado en que el posaconazol se une selectivamente por un anticuerpo. Una medida de la especificidad de un receptor por un ligando es la reactividad cruzada. Los compuestos que reaccionan de forma cruzada se denominan "reactivos cruzados". Los reactivos cruzados pueden ocurrir como resultado de la biotransformación de posaconazol por parte del cuerpo humano a un metabolito, tal como posaconazol, que se biotransforma en un derivado glucurónido de posaconazol. Los anticuerpos anti-posaconazol de la presente divulgación incluyen aquellos que se unen a un epítopo de posaconazol, pero que no se unen de forma detectable a un metabolito de posaconazol, tal como un derivado glucurónido de posaconazol.

Sensibilidad

El término "sensibilidad" se usa en este documento para describir un límite de detección, por ejemplo, la cantidad más pequeña de un analito que da como resultado una señal detectable que se puede distinguir de una señal obtenida en ausencia de analito.

Reactivo

Un reactivo es una sustancia o compuesto que se agrega a un sistema para provocar una reacción química, o se agrega para ver si ocurre una reacción.

Aislado

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" cuando se usa en el contexto de un compuesto aislado, anticuerpo, conjugado, etc., se refiere a un compuesto de interés (por ejemplo, un compuesto como se describe en la presente memoria, un conjugado como se describe en la presente memoria, un anticuerpo tal como se describe en la presente memoria, etc.) que se encuentra en un entorno diferente del que presenta el compuesto de forma natural. "Aislado" pretende incluir compuestos de interés (por ejemplo, un compuesto como se describe en la presente memoria, un conjugado como se describe en la presente memoria, o un anticuerpo como se describe en la presente memoria) que están dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas por el compuesto de interés y/o en el que compuesto de interés está parcial o sustancialmente purificado. Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente puro" se refiere a un compuesto de interés que se elimina de su entorno natural y es 60% o más libre, 75% o más libre, 90% o más libre, 95% o más libre, 98 % o más libre, o 99% o más libre de otros componentes con los que está asociado de forma natural, y/o con los que puede estar asociado durante la síntesis o la producción.

Ciertos compuestos descritos en este documento en conexión con las realizaciones poseen átomos de carbono

asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces. Los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales de estos compuestos están abarcados dentro del alcance de las realizaciones.

Los compuestos se pueden preparar como un isómero individual (por ejemplo, enantiómero, cis-trans, posicional, diastereómero) o como una mezcla de isómeros. En una realización, los compuestos se preparan sustancialmente como un solo isómero. Los métodos para preparar compuestos sustancialmente isoméricamente puros son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las mezclas enantioméricamente enriquecidas y los compuestos enantioméricos puros se pueden preparar usando intermedios sintéticos que son enantioméricamente puros en combinación con reacciones que o bien dejan la estereoquímica en un centro quiral sin cambios o dan como resultado su inversión completa. Alternativamente, el producto final o intermedios a lo largo de la ruta sintética se pueden resolver en un solo estereoisómero. Las técnicas para invertir o dejar sin cambiar un estereocentro particular, y aquellas para resolver mezclas de estereoisómeros son bien conocidas en la técnica y está dentro de la capacidad de un experto en la técnica elegir un método apropiado para una situación particular. Véase, en general, Furniss et al., (eds.), Vogel's Encyclopedia of Practical Organic Chemistry, 5ª edición, Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, páginas 809-816; y Heller, Acc. Chem. Res. 23: 128 (1990).

Cuando los grupos de sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-CH_2O-$ pretende también significar $-OCH_2-$. El uso de un solo guion ("-") o doble guion ("-" o "--") se refiere a un enlace covalente simple, mientras que el uso de "=" se refiere a un doble enlace. El símbolo,$)_2$ o $_2($, cuando se muestra con -S, indica que el compuesto dentro del paréntesis puede estar presente como un dímero que forma un enlace disulfuro. El dímero puede reducirse a un monómero.

Acilo o alcanoilo

El término "acilo" o "alcanoílo" por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarbonado cíclico o de cadena lineal o ramificada, o combinaciones de los mismos, que tengan el número indicado de átomos de carbono y un radical acilo en al menos un extremo del radical alcano. El "radical acilo" es el grupo derivado de un ácido carboxílico eliminando la fracción -OH del mismo.

Alquilo

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, monoinsaturado o poliinsaturado y puede incluir radicales divalentes ("alquileno") y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C_1-C_{10} significa de uno a diez átomos de carbono). Ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil) metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1 - y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también incluye aquellos derivados de alquilo definidos con más detalle a continuación, tales como "heteroalquilo", en donde "heteroalquilo" se refiere a cadenas de carbono que tienen una o más sustituciones en uno o más átomos de carbono del fragmento de cadena hidrocarbonada. Los grupos alquilo que están limitados a grupos hidrocarbonados se denominan "homoalquilo". Ciertos grupos alquilo incluyen aquellos que contienen entre aproximadamente uno y aproximadamente veinticinco átomos de carbono (por ejemplo, metilo, etilo y similares).

Alquilo inferior

El término "alquilo inferior" generalmente se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal, ramificada o cíclica que contiene 8 o menos átomos de carbono, y puede contener de 1 a 8, de 1 a 6, o de 1 a 4 átomos de carbono. Ciertos grupos "alquilo inferior" incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y similares. "Alquilos inferiores" pueden estar opcionalmente sustituidos en uno o más átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada.

Alcoxi, alquilamino y alquiltio

Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan para referirse a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

Heteroátomo

Por "heteroátomo" se entiende átomos distintos de un carbono que pueden estar presentes en una cadena principal de carbono o un compuesto lineal, ramificado o cíclico. Ciertos heteroátomos incluyen oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P) y silicio (Si). Los heteroátomos pueden estar presentes en sus formas reducidas, por ejemplo, -OH, -NH

y -SH.

Heteroalquilo

El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical que contiene carbono cíclico o de cadena lineal o ramificada, o combinaciones de los mismos, que tienen el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo que puede ser un miembro seleccionado entre O, N, Si, P y S, donde los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre están opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno está opcionalmente cuaternizado. Normalmente, los grupos heteroalquilo contienen no más de dos heteroátomos unidos en secuencia. Los heteroátomos O, N, P, S y Si pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CHO-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $CH_2CH=N-OCH_3$ y $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$. Generalmente, hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, $-CH_2-NH-OCH_3$ y $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$.

Heteroalquileno

De forma similar, el término "heteroalquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no está limitado por, $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ y $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$. Para los grupos heteroalquileno, los heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Aún más, para grupos de enlace alquileno y heteroalquileno, no está implicada ninguna orientación del grupo de enlace por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula $-C(O)_2R'-$ representa tanto $-C(O)_2R'-$ como $-R'C(O)_2-$.

Cicloalquilo y heterocicloalquilo

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", solos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no están limitados a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridil), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares.

Arilo

El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, una fracción aromática poliinsaturada que puede ser un único anillo o múltiples anillos (habitualmente de 1 a 3 anillos), que se fusionan entre sí o se unen covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos que son miembros seleccionados entre N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizado. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3- furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5- isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, tetrazolilo, benzo [b] furanilo, benzo [b] tienilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-ilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables que se describen a continuación.

Por brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto anillos arilo como heteroarilo como se definió anteriormente. Por tanto, el término "arilalquilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) que incluyen aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) se ha reemplazado, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi) propilo y similares).

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluye formas sustituidas y no sustituidas del radical indicado. Ciertos sustituyentes para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (que incluyen aquellos grupos denominados a menudo alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) se denominan genéricamente "sustituyentes del grupo alquilo", y puede ser uno o más de una

variedad de grupos seleccionados entre, pero no limitados a: OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO_2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', -NR"$C(O)_2$R', -NR-C(NR'R"R'")=NR"", -NR-C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$NR'R", -$NRSO_2$R', -CN and -NO_2 en un número que varía de cero a (2m' + 1), en donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R', R", R"' y R"" pueden referirse independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi sustituidos o no sustituidos, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de las realizaciones incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente, como lo son cada grupo R', R", R"' y R"", cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo," NR'R" incluye, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF_3 y - CH_2CF_3) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH_3, -C(O)CF_3, -C(O)CH_2OCH_3, y similares).

De forma similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan genéricamente "sustituyentes del grupo arilo". Los sustituyentes se seleccionan de, por ejemplo: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', -OC(O)R'; -C(O)R', -CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', -NR"$C(O)_2$R', -NR-C(NR'R"R'")=NR"", -NR-C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$NR'R", -$NRSO_2$R', -CN y - NO_2, -R', -N_3, -$CH(Ph)_2$, fluoro alcoxi(C_1-C_4) y fluoro alquilo(C_1-C_4), en un número que varía desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R", R"' y R"" pueden seleccionarse independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto de las realizaciones incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente, como lo son cada grupo R', R", R"' y R"", cuando más de uno de estos grupos está presente.

Grupo amino y amina

El término "amino" o "grupo amina" se refiere al grupo -NR'R "(o N^+RR'R") donde R, R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido. Una amina sustituida es un grupo amina en donde R' o R" es distinto de hidrógeno. En un grupo amino primario, tanto R' como R" son hidrógeno, mientras que, en un grupo amino secundario, cualquiera de los dos, pero no ambos R' o R" es hidrógeno. Además, los términos "amina" y "amino" pueden incluir versiones protonadas y cuaternizadas de nitrógeno, que comprende el grupo -N^+RR'R" y sus contraiones aniónicos biológicamente compatibles.

Polipéptido

"Polipéptido" como se usa en la presente memoria pretende abarcar un poliaminoácido de cualquier longitud, y abarca proteínas, fragmentos de proteínas y péptidos. Los polipéptidos pueden codificarse genéticamente o producirse sintéticamente. Los polipéptidos también se pueden modificar, por ejemplo, por modificación postraduccional y/o química.

Marcador detectable

Como se usa en este documento, un "marcador detectable" generalmente se refiere a un marcador de identificación que puede proporcionar una señal detectable, por ejemplo, luminiscencia (por ejemplo, fotoluminiscencia (por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia)), quimioluminiscencia (por ejemplo, bioluminiscencia), agregación o formación de micropartículas, radioactividad, inmunodetección, actividad enzimática y similares.

Anticuerpo marcado en forma detectable

Por "anticuerpo marcado en forma detectable" se entiende un anticuerpo (que, como se definió anteriormente, incluye fragmentos de unión a antígeno, etc.) que tiene un marcador detectable unido. El marcador detectable puede unirse mediante conjugación química, pero cuando el marcador es un polipéptido, podría unirse alternativamente mediante técnicas de ingeniería genética. Se pueden usar diversos métodos para la producción de proteínas marcadas en forma detectable. Los marcadores detectables se pueden seleccionar de una variedad de dichos marcadores conocidos en la técnica, pero normalmente son radioisótopos, fluoróforos, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante) u otras fracciones o compuestos que emiten una señal detectable (por ejemplo, radioactividad, fluorescencia, color) o emiten una señal detectable después de la exposición del marcador a su sustrato. Se pueden usar diversos pares de marcador/sustrato detectables (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante/diaminobenzidina, avidina/estreptavidina, luciferasa/luciferina), métodos para marcar anticuerpos, y métodos para usar anticuerpos marcados para detectar un antígeno.

Complejo anticuerpo-analito y complejo anticuerpo-antígeno

El "complejo anticuerpo-analito", "complejo anticuerpo-antígeno" generalmente se refiere a un complejo que resulta

después de la unión específica de un anticuerpo y su antígeno o analito, por ejemplo, entre un anticuerpo anti-posaconazol y posaconazol (o un fragmento de posaconazol, por ejemplo, un conjugado de posaconazol).

Evaluación

El término "evaluación" incluye cualquier forma de medición e incluye determinar la presencia o ausencia de un elemento. Los términos "evaluación", "determinación" (por ejemplo, como en "determinar la presencia o ausencia de"), "medición", "evaluación" y "ensayo" se usan indistintamente e incluyen determinaciones cuantitativas y cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta. "Evaluación de la presencia de" incluye determinar la cantidad de algo presente y/o determinar si está presente o ausente. Tal como se usa en el presente documento, los términos "determinación", "medición" y "evaluación" y "ensayo" se usan indistintamente e incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas.

Descripción detallada

Antes de que se describan las realizaciones, debe entenderse que las realizaciones de la presente divulgación no están limitadas a las realizaciones particulares descritas y, como tales, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, también se describe específicamente hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de las realizaciones. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el que ninguno de los dos límites está incluido en los intervalos más pequeños también está incluido dentro de las realizaciones, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en las realizaciones.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de las realizaciones, a continuación, se describen algunos métodos y materiales. Se entiende que la presente divulgación reemplaza cualquier divulgación de una publicación incorporada en la medida en que exista una contradicción.

También se observa que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un conjugado" incluye una pluralidad de tales conjugados y la referencia a "la muestra" incluye referencia a una o más muestras y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones discutidas en este documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente solicitud no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar confirmación independiente.

Inmunoensayos

Los inmunoensayos (también conocidos como sistemas de prueba de inmunodiagnóstico) miden un ligando o analito objetivo, el mesurando (por ejemplo, posaconazol), usando las propiedades de unión selectiva de un anticuerpo y un sistema generador de señal que incluye una fracción generadora de señal que es sensible o reactiva a la presencia de anticuerpo debido a la unión del anticuerpo con un miembro del par de unión específica (sbp) (por ejemplo, hapteno) conjugado con la fracción generadora de señal. Tres clases de inmunoensayos son los siguientes: (1) ensayos de captura de anticuerpos; (2) ensayos de captura de antígeno; y (3) ensayos tipo sándwich de dos anticuerpos. Adicionalmente, se contempla que puedan desarrollarse nuevos inmunoensayos que sean capaces de emplear los miembros de sbp (por ejemplo, derivados de hapteno) y anticuerpos que forman el par de unión específica de las realizaciones de la presente divulgación.

Los inmunoensayos enzimáticos homogéneos usan conjugados de enzima-miembro de sbp cuya actividad enzimática se puede modular tras la unión del compañero sbp. En un aspecto, las realizaciones proporcionan conjugados de enzima-miembro de sbp y anticuerpos para realizar ensayos que son útiles en inmunoensayos. En ciertas realizaciones, el inmunoensayo es un inmunoensayo homogéneo, donde el término "inmunoensayo homogéneo", como se usa en este

documento, se refiere a un método de ensayo donde el complejo del par de unión específico está típicamente en solución y no separado de los componentes de reacción sin reaccionar, en vez de eso la presencia del complejo es detectada por una propiedad que al menos uno de los reactivos adquiere o pierde como resultado de ser incorporado en el complejo. Los ensayos homogéneos incluyen sistemas que implican fluorocromos y pares de inactivación de fluorocromos en diferentes reactivos (patentes de Estados Unidos Nos. 3.996.345, 4.161.515, 4.256.834 y 4.264.968); pares de enzimas y de inhibidores de enzimas en diferentes reactivos (patentes de Estados Unidos Nos. 4.208.479 y 4.233.401); pares de cromóforos y modificadores de cromóforos en diferentes reactivos (patente de Estados Unidos No. 4.208.479); y ensayos de aglutinación de látex (patentes de Estados Unidos Nos. 3.088.875, 3.551.555, 4.205.954 y 4.351.824).

En ciertas realizaciones, los inmunógenos, tales como inmunógenos que incluyen una proteína (por ejemplo, una proteína transportadora inmunogénica) conjugada a un fragmento de posaconazol (por ejemplo, un fragmento de posaconazol de acuerdo con un compuesto de Fórmula 1 de la presente invención), pueden sintetizarse y usarse para preparar anticuerpos específicos para posaconazol. Los anticuerpos anti-posaconazol pueden usarse en métodos para detectar posaconazol en muestras sospechosas de contener posaconazol. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-posaconazol son anticuerpos no naturales.

En ciertas realizaciones, los conjugados de marcador se pueden preparar y emplear en los inmunoensayos descritos en la presente memoria. Los conjugados de marcador pueden incluir un marcador conjugado con un fragmento de posaconazol (por ejemplo, un fragmento de posaconazol de acuerdo con un compuesto de Fórmula 1 de la presente invención). En ciertas realizaciones, los inmunoensayos pueden facilitar el cribado de muestras por la presencia de posaconazol.

Los anticuerpos anti-posaconazol, ya sean monoclonales o policlonales, pueden usarse en inmunoensayos para identificar la presencia de posaconazol en una muestra biológica, tal como sangre, plasma, suero, orina, tejido y similares. Los inmunoensayos pueden facilitar la identificación o determinación de parámetros farmacocinéticos y/o farmacodinámicos para posaconazol en un paciente o población de pacientes. Los anticuerpos anti-posaconazol se pueden usar en ensayos de inmunodiagnóstico configurados para identificar la presencia y opcionalmente cuantificar la cantidad de posaconazol en una muestra. Adicionalmente, los ensayos de inmunodiagnóstico pueden usar fragmentos de posaconazol de acuerdo con realizaciones como se describe en el presente documento.

Fragmento de posaconazol

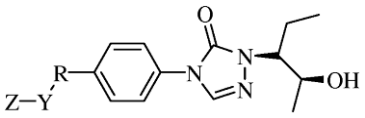
La estructura química de posaconazol (1) se muestra en la FIG. 1. En algunos casos, el posaconazol circula principalmente como el compuesto original en el plasma. En algunos casos, de los metabolitos circulantes, la mayoría son conjugados glucurónidos formados a través de glucuronidación UDP (enzimas de fase 2). En ciertos casos, el posaconazol no se oxida sustancialmente con metabolitos oxidativos (mediados por CYP450). En algunas realizaciones, los anticuerpos de posaconazol como se describen en este documento no se unen en forma detectable a un metabolito de posaconazol. En algunos casos, los anticuerpos de posaconazol tienen una reactividad cruzada con un metabolito de posaconazol de 25% o menos, tal como 20% o menos, incluido 15% o menos, o 10% o menos, o 5% o menos, o 3% o menos, o 2% o menos, o 1,5% o menos, o 1% o menos con respecto a la unión a posaconazol. Por ejemplo, los anticuerpos de posaconazol pueden tener una reactividad cruzada con un metabolito de posaconazol del 10% o menos con respecto a la unión a posaconazol.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de posaconazol como se describen en la presente memoria no reaccionan sustancialmente de forma cruzada con otros triazoles, tales como fluconazol, itraconazol y voriconazol. Por ejemplo, en ciertos casos, puede haber más de un triazol antifúngico en una muestra cuando un sujeto cambia de un tratamiento a otro. Como tal, en ciertas realizaciones, los anticuerpos de posaconazol como se describen en la presente memoria no reaccionan sustancialmente en forma cruzada con otros triazoles con el fin de cuantificar el posaconazol en la muestra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de posaconazol tienen una reactividad cruzada con otros triazoles (por ejemplo, fluconazol, itraconazol y voriconazol) del 10% o menos, tal como 5% o menos, o 3% o menos, o 2% o menos, o 1,5% o menos, o 1% o menos, o 0,5% o menos, o 0,1% o menos cada uno con respecto a la unión a posaconazol. En algunas realizaciones, los anticuerpos de posaconazol tienen una reactividad cruzada con fluconazol, itraconazol y voriconazol de 1,5% o menos cada uno con respecto a la unión a posaconazol. En algunas realizaciones, los anticuerpos de posaconazol tienen una reactividad cruzada con fluconazol, itraconazol y voriconazol de 1% o menos cada uno con respecto a la unión a posaconazol. En algunas realizaciones, los anticuerpos de posaconazol tienen una reactividad cruzada con fluconazol, itraconazol y voriconazol de 0,5% o menos cada uno con respecto a la unión a posaconazol. En algunas realizaciones, los anticuerpos de posaconazol tienen una reactividad cruzada con fluconazol, itraconazol y voriconazol de 0,1% o menos cada uno con respecto a la unión a posaconazol.

En ciertas realizaciones, los fragmentos de posaconazol pueden usarse para desarrollar un ensayo específico para posaconazol. En algunos casos, un fragmento de posaconazol (2) es un hapteno, donde una parte de la estructura química del posaconazol se incluye en el fragmento de posaconazol y se usa para preparar inmunógenos y elevar los anticuerpos para el posaconazol. En ciertos casos, la unión del hapteno (véase, por ejemplo, la Fig. 3, POS-IV) a una proteína transportadora se realizó a través de un sitio en el fragmento de posaconazol (2) alejado de la fracción objetivo utilizada para generar anticuerpos selectivos específicos para posaconazol.

En ciertas realizaciones, el fragmento de posaconazol descrito en la presente memoria se puede usar en inmunógenos y conjugados de marcador de la presente divulgación. Por ejemplo, los inmunógenos y los conjugados de marcador pueden incluir el fragmento POS-IV.

Los aspectos de la presente divulgación incluyen un compuesto de Fórmula 1 que se muestra a continuación:



Fórmula 1

donde

R es CH_2, NH, NHCO, S u O;
Y es un grupo de enlace; y
Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -OH, -SH, -S-acilo; -O-alquilo inferior, halógeno, $-NH_2$, epoxi, maleimidilo, haloacetamida, carboxilo, carboxilo activado, un transportador inmunogénico, una proteína y un marcador, y sales de los mismos.

En ciertas realizaciones, el carboxilo activado es una forma activada de carboxilo que incluye, pero no se limita a, hidroxisuccinimidilo, succinimidilo, carbonato, anhídrido e imidato. En ciertas realizaciones, el carboxilo activado es hidroxisuccinimidilo. En ciertas realizaciones, el carboxilo activado es succinimidilo. En ciertas realizaciones, el carboxilo activado es un carbonato. En ciertas realizaciones, el carboxilo activado es un anhídrido. En ciertas realizaciones, el carboxilo activado es un imidato.

En ciertas realizaciones, R es CH_2, NH, NHCO, S u O. En ciertas realizaciones, R es CH_2. En ciertas realizaciones, R es NH. En ciertas realizaciones, R es NHCO. En ciertas realizaciones, R es S. En ciertas realizaciones, R es O.

En ciertas realizaciones, Y es un grupo de enlace, como se describe en más detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -OH, -SH, -S-acilo; -O-alquilo inferior, halógeno, $-NH_2$, epoxi, maleimidilo, haloacetamida, carboxilo y carboxilo activado. En ciertas realizaciones, Z se selecciona del grupo que consiste en -OH, -SH, halógeno, $-NH_2$, maleimidilo, carboxilo y carboxilo activado. En ciertas realizaciones, Z es carboxilo o carboxilo activado. En ciertas realizaciones, Z es carboxilo. En ciertas realizaciones, Z es carboxilo activado. En ciertas realizaciones, Z es hidroxisuccinimidilo. En ciertas realizaciones, Z es succinimidilo. En ciertas realizaciones, Z es halógeno, tal como F, Cl, Br o I. En ciertas realizaciones, Z es bromo. En ciertas realizaciones, Z es $-NH_2$. En ciertas realizaciones, Z es -SH.

En ciertas realizaciones, Z es un transportador inmunogénico. Los ejemplos de portadores inmunogénicos incluyen proteínas, péptidos, glicoproteínas, sacáridos, partículas, ácidos nucleicos y polinucleótidos. En ciertas realizaciones, Z es un transportador inmunogénico que es una proteína. Los ejemplos de proteínas transportadoras inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, hemocianinas, globulinas y albúminas. Los ejemplos de ciertas proteínas transportadoras inmunogénicas incluyen hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o albúmina de suero humano (HSA). En ciertas realizaciones, Z es una proteína transportadora inmunogénica que se selecciona de BSA y KLH. En ciertas realizaciones, el transportador inmunogénico es un polisacárido.

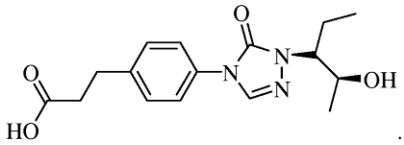
En ciertas realizaciones, Z es un marcador. Los ejemplos de marcadores para Z incluyen, pero no se limitan a, marcadores isotópicos y marcadores no isotópicos (por ejemplo, fracciones generadoras de señal). Los ejemplos de marcadores isotópicos incluyen, pero no se limitan a, ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{32}P, ^{33}P, ^{35}S, ^{125}I, y similares. Los ejemplos de marcadores no isotópicos incluyen fracciones generadoras de señal, tales como, pero sin limitación, fluoróforos y enzimas, que se describen con más detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, el marcador es un fluoróforo. Ciertos fluoróforos incluyen, pero sin limitación, derivados de naftaleno (por ejemplo, cloruro de dansilo), derivados de antraceno (por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida de propionato de antraceno), derivados de pireno (por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida de butirato de pireno), derivados de fluoresceína (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína), derivados de rodamina (por ejemplo, isotiocianato de rodamina), ficoeritrina, Rojo Texas, y similares.

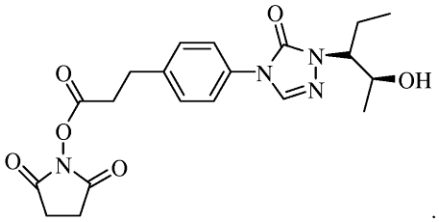
En ciertas realizaciones, el marcador es una enzima. Ciertas enzimas incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, lisozima, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), lactato deshidrogenasa, β-galactosidasa y ureasa. Además, se puede usar un fragmento genéticamente modificado de una enzima, tal como el fragmento donante y aceptor de β-galactosidasa utilizado en los inmunoensayos de CEDIA. En ciertas realizaciones, la enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. En ciertas realizaciones, la enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

En ciertas realizaciones, R es CH_2, Y es un grupo de enlace, tal como un grupo de enlace alquileno (por ejemplo, un

grupo de enlace alquileno sustituido o no sustituido), y Z es un carboxilo o carboxilo activado. Por ejemplo, en ciertos casos, R es CH_2, Y es un grupo de enlace alquileno que incluye un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo CH_2) y Z es un carboxilo. En ciertas realizaciones, la Fórmula 1 es un compuesto de la fórmula:



En ciertas realizaciones, en la Fórmula 1, R es CH_2, Y es un grupo de enlace, tal como un grupo de enlace alquileno (por ejemplo, un grupo de enlace alquileno sustituido o no sustituido), y Z es un carboxilo o carboxilo activado. Por ejemplo, en ciertos casos, R es CH_2, Y es un grupo de enlace alquileno que incluye un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo CH_2) y Z es un carboxilo activado, tal como un carboxilo activado que incluye un hidroxisuccinimidilo. En ciertas realizaciones, la Fórmula 1 es un compuesto de la fórmula:



Grupo de enlace

Un grupo de enlace (también denominado aquí como un enlazador) tiene al menos 1 cadena ininterrumpida de átomos que se extiende entre las subestructuras, tal como se representa como Y en la Fórmula 1. Los átomos de un grupo de enlace están ellos mismos conectados por enlaces químicos. El número de átomos en un grupo de enlace se determina contando los átomos distintos de hidrógeno. En algunas realizaciones, el grupo de enlace es una parte del compuesto de las realizaciones. En algunas realizaciones, el enlazador puede proporcionar una conexión entre, por ejemplo, el fragmento de posaconazol (2) como se muestra en la FIG. 1 y el grupo Z como se muestra en un compuesto de Fórmula 1.

Los compuestos se pueden conectar a otras especies mediante unión entre un grupo funcional reactivo en el compuesto o un enlazador unido al compuesto, y un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en la otra especie. Un enlazador puede ser, por ejemplo, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y combinaciones de los mismos. Un enlazador también puede incluir grupos cíclicos y/o aromáticos como parte de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos de la cadena. En algunas realizaciones, el enlazador puede usarse para proporcionar un sitio disponible en un hapteno para conjugar el hapteno, por ejemplo, con un marcador, transportador, transportador inmunogénico o similar. La molécula enlazadora puede usarse para conectar (conjugar o acoplar) el ligando, hapteno, epítopo o fracción epitópica con su transportador inmunogénico o fracción generadora de señal y visualizar el ligando, hapteno, epítopo o fracción epitópica para unirse a un receptor o anticuerpo. La longitud del enlazador puede variarse para lograr el resultado deseado en la producción del inmunógeno o el sistema de generación de señal.

En ciertas realizaciones de la Fórmula 1, el grupo de enlace incluye de 1 a 15 átomos y puede incluir una cadena de 1 a 8 átomos, cada uno independientemente seleccionado del grupo que consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno, halógeno y fósforo. Los ejemplos de grupos de enlace incluyen-$(CH_2)_n$-, -$(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-, -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-NHC(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-NHC(O)$(CH_2)_n$-, -$(CH_2)_n$SCH_2C(O)-, -$(CH_2)_n$-C(O)NH-$(CH_2)_n$-, -$(CH_2)_n$-NH-C(O)-,-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-$(CH_2)_n$-, -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)O-, o -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)NH-, donde n es un número entero de 1 a 10, y que incluye sus sales.

En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es-$(CH_2)_n$-, donde n es un número entero de uno a diez. En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es-$(CH_2)_n$-, donde n es un número entero de uno a seis. En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es-$(CH_2)_n$-, donde n es uno o dos. En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es-$(CH_2)_n$-, donde n es uno.

En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es-$(CH_2)_n$-C(O)-, donde n es un número entero de uno a diez. En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es-$(CH_2)_n$-C(O)-, donde n es un número entero de uno a seis. En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es-$(CH_2)_n$-C(O)-, donde n es uno o dos. En ciertas realizaciones, el grupo de enlace es-$(CH_2)_n$-C(O)-, donde n es uno.

El número de heteroátomos en el grupo de enlace puede variar de 0 a 6, tal como de 1 a 5 heteroátomos. El grupo de

enlace puede ser alifático o aromático. Cuando hay heteroátomos, el oxígeno puede estar presente como oxo u oxi, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo; el nitrógeno puede estar presente como nitro, nitroso o amino, y puede estar unido a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre puede estar presente en grupos funcionales análogos al oxígeno; el fósforo puede estar unido a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, tal como fosfonato y fosfato mono o diéster. En ciertas realizaciones, las funciones en la formación de un enlace covalente entre el grupo de unión y la molécula a conjugar incluyen, pero sin limitación, alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter, carboxilato, sulfonato, éster de fosfato, amida y tioésteres.

En ciertas realizaciones, cuando un grupo de enlace tiene un grupo no oxocarbonilo que incluye análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, un agente alquilante tal como halo o tosilalquilo, oxi (hidroxilo o el análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona), u olefina activa tal como una vinilsulfona o un éster α, β-insaturado, estas funciones pueden estar unidas a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. En ciertas realizaciones, cuando se unen una amina y un ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se forman amidas, amidinas y fosforamidas. En ciertas realizaciones, cuando se unen mercaptano y olefina activada, se forman tioéteres. En ciertas realizaciones, cuando se unen un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. En ciertas realizaciones, cuando el aldehído y una amina están unidos en condiciones reductoras, se forma una alquilamina. En ciertas realizaciones, cuando se unen un ácido carboxílico o fosfato ácido y un alcohol, se forman ésteres. Se describen diversos agentes de enlace, por ejemplo, en Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245: 3059.

Los grupos de enlace que unen un transportador a un hapteno pueden incluir nucleótidos, nucleósidos, polímeros, azúcares y otros carbohidratos modificados o no modificados, poliéteres, tales como, por ejemplo, polietilenglicoles, polialcoholes, polipropilenos, propilenglicoles, mezclas de etileno y propilenglicoles, polialquilaminas, poliaminas tales como espermidina, poliésteres tales como poli(acrilato de etilo), polifosfodiésteres y alquilenos. Un ejemplo de un grupo operativo y su enlazador es colesterol-TEG-fosforamidita, en donde el colesterol es el grupo operativo y el tetraetilenglicol y el fosfato sirven como enlazadores.

En algunas realizaciones, el transportador inmunogénico es una proteína. Los transportadores de proteína pueden ser altamente solubles e incluyen grupos funcionales que pueden facilitar la conjugación con una molécula de hapteno. En ciertas realizaciones, el transportador inmunogénico se selecciona de hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) y albúmina de suero humano (HSA). KLH es una gran proteína transportadora de oxígeno de la lapa de ojo de cerradura marina y exhibe inmunogenicidad aumentada cuando se desasocia en subunidades. BSA es una proteína altamente soluble que contiene numerosos grupos funcionales adecuados para la conjugación.

Fragmentos

Se pueden usar fragmentos de posaconazol de acuerdo con algunas realizaciones para competir por la unión con un receptor que incluye un anticuerpo que reconoce tanto el fragmento como el posaconazol. Un fragmento puede incluir un grupo operativo acoplado a posaconazol o un fragmento de posaconazol a través de un enlazador. Por lo tanto, las realizaciones proporcionan fragmentos de posaconazol unidos, por ejemplo, a un transportador inmunogénico y/o una fracción generadora de señal como grupos operativos.

Sistema de producción de señal

El sistema de producción de señal se utiliza en ensayos para analitos y puede tener uno o más componentes. En ciertas realizaciones, el componente es una G6PDH mutante. El sistema de producción de señal puede configurarse para generar una señal que se relaciona con la presencia o cantidad de analito en una muestra. El sistema de producción de señal puede incluir reactivos para producir una señal medible. En algunos casos, la G6PDH o una proteína marcadora que incluye fosfatasa alcalina, β-galactosidasa y peroxidasa de rábano picante se conjuga con un análogo del miembro de sbp al analito.

Otros componentes del sistema de producción de señales pueden incluir sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, depuradores, iones metálicos, sustancias de unión específica requeridas para la unión de sustancias generadoras de señal, coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, y similares.

El sistema de producción de señal proporciona una señal detectable por medios externos, normalmente mediante medición de radiación electromagnética, tal como una señal detectable por examen visual. En algunos casos, el sistema de producción de señal puede incluir un sustrato cromóforo y la enzima G6PDH mutante, donde los sustratos cromóforos se convierten enzimáticamente en colorantes que absorben luz en la región ultravioleta o visible.

Cambio sustancial en la actividad de la enzima

Un cambio sustancial en la actividad de una enzima es un cambio en la actividad enzimática suficiente para permitir la detección de un analito cuando la enzima se usa como marcador en un ensayo para el analito. En algunas realizaciones, la actividad de la enzima se reduce en un 10-100%, tal como una reducción en un 20-99%, que incluye

una reducción en un 30-95%.

Materiales auxiliares

Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en un ensayo de acuerdo con las realizaciones. Por ejemplo, pueden estar presentes reguladores en el medio de ensayo. En algunos casos, pueden incluirse estabilizadores para el medio de ensayo y los componentes del ensayo. En ciertas realizaciones, se pueden incluir proteínas adicionales, tales como albúminas o tensioactivos, tales como tensioactivos no iónicos, potenciadores de unión, por ejemplo, polialquilenglicoles, y similares.

Anticuerpos anti-posaconazol

Como se describió anteriormente, el término "anticuerpo" como se usa en el presente documento, se refiere a un compañero de unión específico de un analito (por ejemplo, posaconazol), y se entiende que abarca anticuerpos completos así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos (tales como por ejemplo, $F(ab')_2$, Fab', Fab y Fv), anticuerpos de origen natural, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpos que conservan la especificidad de unión al antígeno y similares. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgM, IgG, IgA, IgE; con frecuencia IgG) y generarse a partir de cualquier fuente (aunque generalmente no humana, tal como un mamífero no humano, como un conejo, ratón, rata, cabra, etc.). De este modo, "anticuerpo" pretende abarcar no solo moléculas de inmunoglobulina intactas, sino también dichos fragmentos y derivados de moléculas de inmunoglobulina, y retener la actividad del anticuerpo de una inmunoglobulina intacta.

Los anticuerpos pueden derivarse de composiciones policlonales o composiciones monoclonales. Como se indicó anteriormente, también se pretende que los "anticuerpos" abarquen anticuerpos monocatenarios o scFvs, donde dichos fragmentos de anticuerpos producidos de forma recombinante retienen las características de unión de los anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos producidos de forma recombinante dentro del significado de "anticuerpo" generalmente incluyen al menos los dominios VH y VL de los anticuerpos en cuestión, para retener las características de unión de los anticuerpos en cuestión. Estos fragmentos de anticuerpos producidos de forma recombinante se pueden preparar fácilmente usando cualquier metodología conveniente, tal como la metodología descrita en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.851.829 y 5.965.371.

Los anticuerpos anti-posaconazol incluyen aquellos que se unen a uno o más epítopos de posaconazol. Los anticuerpos anti-posaconazol pueden unirse a uno o más entre posaconazol no conjugado, un fragmento de posaconazol, un conjugado de posaconazol, un conjugado de un fragmento de posaconazol o cualquier combinación de los mismos. La divulgación abarca un anticuerpo reactivo para un epítopo común presente en posaconazol y los compuestos mostrados en la Fórmula 1. Dichos anticuerpos pueden por lo tanto unir un epítopo de posaconazol como el presente en posaconazol y una fracción posaconazol (por ejemplo, un fragmento de posaconazol) como el presente en un compuesto de Fórmula 1.

Producción de anticuerpos anti-posaconazol

Los anticuerpos anti-posaconazol se pueden preparar usando un conjugado de posaconazol inmunogénico descrito en la presente memoria y aplicando métodos para la producción de anticuerpos. Los ejemplos de técnicas generales usadas en la elevación, purificación y modificación de anticuerpos, y el diseño y ejecución de inmunoensayos se describen en el Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., Eds., 1991); David Wild, ed., The Immunoassay Handbook (Stockton Press, N.Y., 1994); y R. Masseyeff, W. H. Albert, y N. A. Staines, eds., Methods of Immunological Analysis (Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993).

Los anticuerpos obtenidos usando cualquiera de las técnicas descritas se seleccionan o purifican no solo por su capacidad para reaccionar con posaconazol, sino por una baja reactividad cruzada con posibles sustancias interferentes. La "reactividad cruzada" puede determinarse en un inmunoensayo cuantitativo estableciendo una curva estándar usando diluciones conocidas del analito objetivo, posaconazol. La curva estándar se usa luego para calcular la concentración aparente de la sustancia interferente presente en varias cantidades conocidas en muestras analizadas en condiciones similares. La reactividad cruzada se puede calcular como la concentración aparente dividida por la concentración real multiplicada por 100. Un cierto inmunoensayo para determinar la reactividad cruzada es un inmunoensayo enzimático homogéneo que usa una G6PDH de tipo silvestre como se describe en la patente de Estados Unidos No. 3.817.837 o G6PDH mutante diseñada para contener una cisteína por subunidad como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.033.890, 6.090.567 y 6.455.288. Además, la reactividad cruzada puede determinarse en el mismo tipo de inmunoensayo en el que finalmente se usará el anticuerpo.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-posaconazol de la presente divulgación tienen una reactividad cruzada del 25% o menos, tal como 20% o menos, o 15% o menos, o 10% o menos, o 5% o menos, o 3% o menos, o 1% o menos, con respecto a la unión del anticuerpo anti-posaconazol a otras sustancias. Por ejemplo, los anticuerpos anti-posaconazol de la presente divulgación tienen una reactividad cruzada de 25% o menos, tal como 20% o menos, o 15% o menos, o 10% o menos, o 5% o menos, o 3% o menos, o 1% o menos, con respecto a la unión del anticuerpo anti-

posaconazol a otros agentes activos, tales como otros fármacos triazólicos, que incluyen, por ejemplo, fluconazol, itraconazol y voriconazol.

Producción de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales que se unen a posaconazol pueden aumentarse mediante la administración de un conjugado de posaconazol inmunogénico a un huésped animal (por ejemplo, un ratón, oveja o conejo, etc.), en algunos casos también mezclado con un adyuvante. Se puede usar cualquier huésped animal que produzca anticuerpos. El inmunógeno puede prepararse para inyección rehidratando el inmunógeno liofilizado para formar una solución o suspensión. Ciertos adyuvantes son inmersiones de agua en aceite, tal como el adyuvante completo de Freund para la primera administración, y el adyuvante incompleto de Freund para dosis de refuerzo. La preparación se administra típicamente en una variedad de sitios, y típicamente en dos o más dosis durante el transcurso de una o más semanas (por ejemplo, 4 semanas o más). El suero se cosecha y prueba para determinar la presencia de anticuerpos anti-posaconazol usando un conjugado de posaconazol-proteína u otros conjugados de posaconazol en un inmunoensayo o reacción de precipitación estándar. Esta técnica es generalmente aplicable para producir anticuerpos policlonales para fragmentos de posaconazol como se describe en este documento y para evaluar su utilidad.

Los métodos para purificar anticuerpos específicos que tienen una especificidad de unión deseada a partir de un antisuero policlonal son conocidos en la técnica. Un ejemplo de un método es la purificación por afinidad usando una columna de posaconazol conjugada con una fase sólida. Una forma de preparar una columna de posaconazol es conjugar el posaconazol o un fragmento de posaconazol a una proteína distinta de la proteína utilizada en el inmunógeno, y luego unir el conjugado a una resina activada disponible comercialmente, tal como SEPHAROSE^{MR} activada por CNBr. El anticuerpo anti-posaconazol se pasa por la columna, la columna se lava y el anticuerpo se eluye con un regulador desnaturalizante suave, tal como glicina 0,1 M, NaCl 0,2 M, pH 2,5.

Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales anti-posaconazol se pueden preparar mediante varias técnicas diferentes. Por ejemplo, por la tecnología de hibridoma, las técnicas para producir anticuerpos monoclonales se describen en Harrow E, Lane D., 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press y Methods in Enzymology, 73B:3 (1981). En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales se producen inmortalizando y clonando un esplenocito u otra célula productora de anticuerpos recuperada de un animal que ha sido inmunizado contra posaconazol como se describió anteriormente. El clon puede inmortalizarse mediante un procedimiento tal como fusión con un mieloma no productor, transfectando con virus de Epstein Barr o transformando con ADN oncogénico. Las células tratadas pueden clonarse y cultivarse, y pueden seleccionarse clones que produzcan anticuerpos de la especificidad deseada. La prueba de especificidad puede realizarse sobre sobrenadantes de cultivo mediante una serie de técnicas, tales como el uso del antígeno inmunizante como reactivo de detección en un inmunoensayo. A continuación, puede purificarse un suministro de anticuerpo monoclonal del clon seleccionado a partir de un gran volumen de sobrenadante de cultivo, o a partir del fluido de ascitis de animales huésped preparados adecuadamente inyectados con el clon. El anticuerpo puede someterse a prueba en cuanto a la actividad como sobrenadante en bruto o ascitis, y se purifica opcionalmente usando técnicas de preparación bioquímica, tales como, pero sin limitación, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel.

Producción de fragmentos y otros derivados de inmunoglobulinas

Se pueden preparar fragmentos y otros derivados de inmunoglobulinas mediante métodos de química de proteínas estándar, por ejemplo, sometiendo el anticuerpo a escisión con una enzima proteolítica tal como pepsina, papaína o tripsina; y reduciendo los enlaces disulfuro con reactivos tales como ditiotreitol. Se pueden producir variantes genéticamente modificadas de inmunoglobulina intacta obteniendo un polinucleótido que codifica el anticuerpo, y aplicando los métodos generales de biología molecular para empalmar secuencias codificantes o introducir mutaciones y traducir la variante. Los anticuerpos que son variantes modificadas de particular interés incluyen anticuerpos quiméricos y humanizados, fragmentos de tipo Fab, fragmentos de región variable de cadena sencilla (scFv) y diacuerpos.

Anticuerpos anti-posaconazol marcados de manera detectable

Los anticuerpos anti-posaconazol también pueden marcarse para facilitar la detección. Se puede emplear una variedad de esquemas de marcación de proteínas según se desee dependiendo del uso pretendido del anticuerpo, por ejemplo, inmunoensayo.

Los ejemplos de marcadores incluyen marcadores que permiten tanto la medición directa como indirecta de la presencia del anticuerpo. Los ejemplos de marcadores que permiten la medición directa del anticuerpo incluyen radiomarcadores, tales como ^{3}H o ^{125}I, marcadores fluorescentes, colorantes, micropartículas, perlas, marcadores quimioluminiscentes, partículas coloidales y similares. Los ejemplos de marcadores que permiten la medición indirecta de la presencia del anticuerpo incluyen enzimas en las que un sustrato puede proporcionar un producto coloreado o fluorescente. Por ejemplo, los anticuerpos pueden marcarse con una enzima unida covalentemente capaz de proporcionar una señal de

producto detectable después de la adición del sustrato adecuado. En lugar de unir covalentemente la enzima al anticuerpo, el anticuerpo puede modificarse para comprender un primer miembro del par de unión específico que se une específicamente con un segundo miembro del par de unión específico que está conjugado con la enzima, por ejemplo, el anticuerpo puede estar covalentemente unido a biotina y la enzima conjugada a estreptavidina. Los ejemplos de enzimas adecuadas para uso en conjugados incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, malato deshidrogenasa y similares.

Inmunoensayos

La presente divulgación proporciona métodos de inmunoensayo para evaluar la presencia o la ausencia de posaconazol en una muestra de interés. Los inmunoensayos de la presente divulgación pueden ser de una variedad de formatos. Los inmunoensayos pueden ser inmunoensayos de separación (también conocidos como inmunoensayos heterogéneos) o inmunoensayos homogéneos. Además, los inmunoensayos pueden ser cualitativos o cuantitativos. Los ensayos de esta divulgación incluyen tanto ensayos en sándwich como de competición. Los inmunoensayos pueden incorporar otros tipos de ensayos que no son ni ensayos en sándwich ni de competición, como en ciertos ensayos que implican inmunoprecipitación.

En general, los inmunoensayos de la presente divulgación para detectar la presencia o ausencia de posaconazol en una muestra pueden realizarse añadiendo, a una mezcla de reacción, (i) una muestra sospechosa de contener posaconazol y (ii) un anticuerpo anti-posaconazol capaz de formar un complejo de posaconazol que puede estar presente en la muestra y el anticuerpo; y detectar la presencia o ausencia del complejo. La presencia o ausencia del complejo puede ser indicativa de la presencia o ausencia de posaconazol en dicha muestra. Además, la cantidad de complejo formado puede evaluarse para determinar la concentración de posaconazol presente en la muestra (por ejemplo, para proporcionar una evaluación de la concentración en suero o tisular de posaconazol en un sujeto del que se obtuvo la muestra). La presencia y/o cantidad de complejo se puede evaluar directamente (por ejemplo, detectando anticuerpo unido en el complejo) o indirectamente (por ejemplo, evaluando la actividad de una enzima en un conjugado de enzima posaconazol, donde el conjugado de enzima posaconazol no está ligado a anticuerpo, se genera una señal detectable, lo que indica que el anticuerpo anti-posaconazol en la mezcla de reacción se ha unido mediante posaconazol de la muestra).

En general, los inmunoensayos de la divulgación implican combinar la muestra con un anticuerpo anti-posaconazol en condiciones que permiten la formación de un complejo estable entre el analito a analizar y el anticuerpo.

Los ensayos pueden realizarse en solución o pueden usar un soporte sólido (insoluble) (por ejemplo, poliestireno, nitrocelulosa o perlas), usando cualquier procedimiento estándar (por ejemplo, como se describe en Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Ed.., John Wiley & Sons, Nueva York, 1992). Dichos métodos incluyen ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas), IRMA (ensayos inmunoradiométricos) y RIA (radioinmunoensayos).

Cuando el ensayo se realiza en solución, la muestra de prueba (y, opcionalmente, una muestra de control) puede incubarse con un anticuerpo anti-posaconazol durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de analito y complejos de reactivo de afinidad, por ejemplo, de 0,1 horas a 24 horas, o más. Como se indicó previamente, el anticuerpo anti-posaconazol puede incluir un marcador detectable (por ejemplo, radionúclido, agente fluorescente o enzima). La muestra puede tratarse luego para separar los complejos de posaconazol-anticuerpo anti-posaconazol del anticuerpo anti-posaconazol en exceso sin reaccionar (por ejemplo, mediante la adición de un anticuerpo anti-anti-posaconazol (por ejemplo, antisuero anti-inmunoglobulina) seguido de centrifugación para precipitar los complejos, o mediante unión a una superficie de afinidad tal como un segundo anticuerpo anti-posaconazol no marcado fijado a un sustrato sólido tal como Sepbarose® o un pozo de plástico). La detección del anticuerpo anti-posaconazol unido a un posaconazol se puede lograr de varias maneras. Si es necesario, se puede agregar un sustrato para el marcador detectable a la muestra.

Cuando el ensayo usa un soporte sólido, el soporte puede tener un anticuerpo anti-posaconazol (o conjugado de posaconazol) unido a una superficie de soporte. La unión del reactivo de ensayo facilita la unión estable y resistente al lavado de posaconazol que puede estar presente en la muestra (o anticuerpo anti-posaconazol que no está unido a posaconazol de la muestra, y está presente en la mezcla de reacción, como en un ensayo competitivo de unión) al soporte sólido mediante unión específica al anticuerpo anti-posaconazol. Los soportes insolubles pueden ser cualquier composición a la que se puedan unir anticuerpos o conjugados de posaconazol adecuados, que se puedan separar del material soluble, y que de otro modo sea compatible con el método general de detección del anticuerpo anti-posaconazol en una muestra.

La superficie de tales soportes puede ser sólida o porosa y de cualquier forma conveniente. Los ejemplos de soportes insolubles adecuados a los que se une el anticuerpo anti-posaconazol incluyen perlas, por ejemplo, perlas magnéticas, membranas y placas de microtitulación. Estas pueden estar compuestas de vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa.

Los reactivos de ensayo pueden incluir los anticuerpos anti-posaconazol como se describe en el presente documento, así como anticuerpos anti-anti-posaconazol, que pueden marcarse opcionalmente de forma detectable. Después de la

unión de un reactivo de ensayo al soporte, el soporte puede tratarse con un agente bloqueante, que se une al soporte en áreas no ocupadas por el reactivo de ensayo. Los agentes bloqueantes adecuados incluyen proteínas no interferentes tales como albúmina de suero bovino, caseína, gelatina, y similares. Alternativamente, pueden usarse detergentes en concentraciones no interferentes, tales como Tween, NP40, TX100 y similares. Tal tratamiento de bloqueo puede reducir la unión no específica.

En ciertas realizaciones, el método incluye determinar la presencia de un producto de reacción enzimático del conjugado marcador (por ejemplo, el conjugado de posaconazol). La presencia del producto de reacción enzimática se puede determinar cualitativa y/o cuantitativamente, como se describe con más detalle a continuación. En ciertos casos, el método incluye determinar la velocidad de reacción para la producción del producto de reacción enzimático. Por ejemplo, la absorbancia del producto de reacción enzimática puede determinarse a lo largo de un período de tiempo (por ejemplo, mA/min). En algunas realizaciones, el método incluye determinar la diferencia en la velocidad de reacción a dos concentraciones diferentes de analito (por ejemplo, diferentes concentraciones de posaconazol). Por ejemplo, la velocidad de reacción en una primera concentración de analito puede compararse con la velocidad de reacción en una segunda concentración de analito (por ejemplo, diferente). En ciertas realizaciones, la diferencia entre las velocidades de reacción a diferentes concentraciones de analito es una indicación de la detectabilidad de la señal producida por el ensayo. Por ejemplo, en algunos casos, una mayor diferencia en las velocidades de reacción puede indicar una señal más fácilmente detectable producida por el ensayo. En ciertas realizaciones, la diferencia entre las velocidades de reacción a diferentes concentraciones de analito es 50 mA/min o más, tal como 75 mA/min o más, o 100 mA/min o más, o 125 mA/min o más, o 150 mA/min o más, o 175 mA/min o más, o 200 mA/min o más, o 225 mA/min o más, o 250 mA/min o más, o 275 mA/min o más, o 300 mA/min o más. En ciertos casos, la diferencia entre las velocidades de reacción a diferentes concentraciones de analito es de 275 mA/min o más. En ciertas realizaciones, un ensayo que incluye una composición de anticuerpo policlonal tiene una mayor diferencia en las velocidades de reacción en comparación con un ensayo que incluye anticuerpos monoclonales. En otras realizaciones, un ensayo que incluye anticuerpos monoclonales tiene una mayor diferencia en las velocidades de reacción en comparación con un ensayo que incluye una composición de anticuerpo policlonal.

Métodos cualitativos y cuantitativos

Los ensayos de esta divulgación incluyen ensayos tanto cualitativos como cuantitativos. Los métodos cuantitativos típicos implican mezclar un analito con una cantidad predeterminada del anticuerpo reactivo, y correlacionar la cantidad de complejo formado con la cantidad de analito en la muestra original usando una relación determinada usando muestras estándar (por ejemplo, muestras de referencia) que contienen cantidades conocidas de analito en el intervalo esperado para la muestra que se probará. Por ejemplo, el método para detectar posaconazol en una muestra puede incluir detectar una señal detectable generada por el conjugado marcador (por ejemplo, el conjugado de posaconazol) y comparar la señal detectada con una muestra de referencia. Al correlacionar la señal detectada con señales de la muestra de referencia (por ejemplo, una curva de calibración), se puede determinar la cantidad de analito (por ejemplo, posaconazol) en la muestra. En un ensayo cualitativo, el complejo suficiente por encima o por debajo de un nivel umbral establecido por muestras que se sabe que contienen o están libres de analito establece el resultado del ensayo. A menos que se indique lo contrario, el acto de "medir" o "determinar" en esta divulgación se refiere alternativamente a la determinación cualitativa y cuantitativa.

Muestras

Las muestras pueden ser muestras biológicas tomadas de sujetos sospechosos de ser administrados con posaconazol.

Como se usa en el presente documento, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislada de un sujeto, que en el contexto de las realizaciones generalmente se refiere a muestras sospechosas de contener posaconazol, muestras que, después del procesamiento opcional, pueden ser analizadas en un ensayo in vitro.

Algunas muestras de interés incluyen, pero no se limitan necesariamente a, una "muestra de sangre" (que como se usa en este documento incluye sangre completa, plasma, suero y similares), materia fecal, orina, lágrimas, sudor saliva, leche, órganos, biopsias, secreciones de los tractos intestinal y respiratorio, humor vítreo y otros líquidos como el líquido cefalorraquídeo o fluidos que se obtienen durante la autopsia. Se debe observar que una "muestra derivada de sangre" se refiere a una muestra que se prepara a partir de sangre o una fracción de la misma, por ejemplo, plasma o suero. Secreciones respiratorias (por ejemplo, muestras obtenidas de fluidos o tejido de conductos nasales, pulmón y similares). "Suero humano", como se usa en este documento, se refiere a la porción acuosa de sangre humana que queda después de que se haya eliminado la fibrina y el material suspendido (tal como células).

Pueden obtenerse muestras de sangre, tales como muestras de suero, por cualquier método adecuado. En una realización, se utiliza una cantidad mínima de suero/plasma y el intervalo de concentración es 12-20 mg. Se pueden obtener muestras de sudor utilizando, por ejemplo, un parche de sudor PharmChek® de Sudormed. El parche para el sudor PharmChek® incluye un vendaje semioclusivo que contiene una almohadilla de recolección de papel de celulosa de grado médico, cubierto por una capa delgada de adhesivos de poliuretano y acrilato. Al final del período de uso, la almohadilla se eluye con un regulador adecuado, tal como 2,5 mL de regulador de acetato 0,2 M con metanol a pH 5,0 (25:75) o con acetonitrilo. Además, las muestras biológicas también pueden ser muestras de tejido, que se extraen en

un medio líquido para inmunoensayo. Por ejemplo, las muestras de cabello se pueden analizar extrayendo en un medio líquido. Las muestras pueden diluirse o modificarse para facilitar el ensayo.

Las muestras pueden ser muestras experimentales generadas por cualquier método químico o biológico. Por ejemplo, las muestras pueden ser estándares que contienen concentraciones conocidas de posaconazol u otras sustancias usadas para la calibración del ensayo.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se diluye en una solución adecuada antes del ensayo. En general, una solución adecuada para diluir una muestra biológica puede incluir un regulador, tal como solución salina regulada con fosfato (PBS), y puede incluir elementos adicionales, tales como, por ejemplo, un agente bloqueante inespecífico, tal como albúmina de suero bovino (BSA), un detergente, tal como Triton-X-100, y similares.

Cuando se desee, las muestras de control apropiadas para el ensayo incluyen sangre, suero u orina recogida de sujetos humanos que no han recibido posaconazol (es decir, un control negativo), o muestras que contienen una cantidad conocida y predeterminada de un analito de posaconazol (es decir, un control positivo). Alternativamente, los resultados de la prueba se pueden comparar con niveles de señal detectables que se sabe que están asociados con la presencia o ausencia de posaconazol y/o se correlacionan con una cantidad de posaconazol, por ejemplo, un nivel en suero de posaconazol.

Los ensayos pueden incluir opcionalmente el uso de un estándar de calibración. El "estándar de calibración", como se usa en el presente documento, se refiere a un medio acuoso que contiene posaconazol a una concentración predeterminada. En ciertas realizaciones, una serie de estos estándares de calibración están disponibles en una serie de concentraciones predeterminadas. En ciertas realizaciones, el patrón de calibración es estable a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, los estándares de calibración están en una matriz sintética. En ciertas realizaciones, los estándares de calibración están en una matriz no sintética tal como suero humano.

En algunas realizaciones, una fuente inicial adecuada para la muestra humana es una muestra de sangre. Como tal, la muestra empleada en los ensayos en cuestión puede ser una muestra derivada de sangre. La muestra derivada de sangre puede derivarse de sangre completa o una fracción de la misma, por ejemplo, suero, plasma, etc., donde en algunas realizaciones la muestra se deriva de sangre que se deja coagular y el suero se separa y se recoge para ser usado para análisis.

En realizaciones en las que la muestra es una muestra de suero o derivada de suero, la muestra es generalmente una muestra de fluido. Se puede emplear cualquier metodología conveniente para producir una muestra de suero fluido. En algunas realizaciones, el método emplea la extracción de sangre venosa mediante punción en la piel (por ejemplo, punción en el dedo, venopunción) en un tubo separador de coágulos o suero, permitiendo que la sangre coagule, y centrifugando el suero fuera de la sangre coagulada. El suero se recoge y se almacena hasta que se analiza. Una vez que se obtiene la muestra derivada del paciente, la muestra se analiza para determinar el nivel de analito de posaconazol.

Reactivos de inmunoensayo

Los reactivos de inmunoensayo que encuentran uso solo o en combinación en los ensayos descritos en este documento incluyen anticuerpos anti-posaconazol, conjugados de posaconazol y posaconazol (por ejemplo, como control o en ensayos de unión competitiva). Los reactivos de inmunoensayo pueden proporcionarse en una solución acuosa regulada. Dichas soluciones pueden incluir componentes adicionales tales como aditivos tensioactivos, disolventes orgánicos, antiespumantes, reguladores, tensioactivos y agentes antimicrobianos. Se introducen aditivos de superficie activa para mantener compuestos hidrofóbicos o de baja solubilidad en solución y estabilizar los componentes en la solución. Los ejemplos incluyen agentes de carga tales como betalactoglobulina (BLG) o polietilenglicol (PEG); antiespumantes y tensioactivos tales como Tween-20, Plurafac A38, Triton X-100, Pluronic 25R2, albúmina de suero de conejo (RSA), albúmina de suero bovino (BSA) y carbohidratos. Los ejemplos de disolventes orgánicos pueden incluir metanol y otros alcoholes. Se pueden usar varios reguladores para mantener el pH de la solución durante el almacenamiento. Los reguladores ilustrativos incluyen HEPES, borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. Los agentes antimicrobianos también extienden la vida en almacenamiento del reactivo del inmunoensayo.

Anticuerpos anti-posaconazol

Los inmunoensayos generalmente implican al menos un anticuerpo anti-posaconazol, que se puede producir mediante los métodos descritos en este documento. En ciertas realizaciones, los ensayos implican usar un anticuerpo producido contra un conjugado de fragmento de posaconazol-proteína, tal como un anticuerpo con una baja reactividad cruzada con moléculas que no son de posaconazol que pueden estar presentes en una mezcla de reacción. Los anticuerpos anti-posaconazol pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales capaces de unirse específicamente a posaconazol.

Dependiendo del formato del ensayo, el anticuerpo anti-posaconazol puede marcarse opcionalmente de manera detectable, puede usarse junto con un anticuerpo secundario (es decir, un anticuerpo que se une específicamente a un

anticuerpo anti-posaconazol) que puede marcarse de forma detectable. Ciertos marcadores detectables para anticuerpos se describen en este documento.

Conjugados de posaconazol

Los conjugados de posaconazol encuentran uso como reactivos de inmunoensayo dependiendo del formato del ensayo. Por ejemplo, un conjugado de posaconazol puede actuar como reactivo de unión competitiva en ensayos de unión competitiva, o puede proporcionar una señal detectable cuando no está unido a un anticuerpo anti-posaconazol (por ejemplo, cuando el conjugado de posaconazol es un conjugado de posaconazol G6PDH). Ciertos conjugados de posaconazol útiles como reactivos de inmunoensayo se describen a continuación.

Marcadores detectables

Se puede usar una variedad de marcadores detectables en conexión con los reactivos de ensayo del conjugado de posaconazol para uso en los métodos descritos en este documento. Tales marcadores detectables pueden ser marcadores isotópicos. En otras realizaciones, los marcadores detectables son fracciones generadoras de señal no isotópicas, tales como fluoróforos y enzimas. Ciertos marcadores detectables se describen a continuación. Será evidente que, aunque los marcadores detectables se describen a continuación en el contexto de su uso en conjugados de posaconazol, también se pueden adaptar para usar con anticuerpos anti-posaconazol.

Fluoróforos

"Fluoróforo" como se usa en el presente documento se refiere a una fracción que fluoresce por sí misma, puede hacerse fluorescer, o puede proporcionar la extinción de la fluorescencia de un fluoruro de un par de FRET (por ejemplo, tal como en un par de FRET). En principio, se puede usar cualquier fluoróforo en los ensayos de las realizaciones. En general, el fluoróforo se selecciona para que sea compatible para usar en el formato de ensayo deseado, y se selecciona de manera que sea relativamente insensible a las condiciones del ensayo, por ejemplo, pH, polaridad, temperatura y fuerza iónica.

Ciertos fluoróforos se pueden caracterizar por tener las siguientes características: (a) una vida útil de fluorescencia superior a 15 nseg; (b) una longitud de onda de excitación superior a 350 nm; (c) un desplazamiento de Stokes (un desplazamiento hacia la longitud de onda inferior de la emisión con respecto a la absorción) mayor a 20 nm; (d) para ensayos homogéneos descritos a continuación, el tiempo de vida de la fluorescencia debe variar con el estado de unión; y (e) la absortividad y el rendimiento cuántico del fluoróforo deberían ser altos. La vida más larga es ventajosa porque puede facilitar la medición y puede distinguirse más fácilmente de la dispersión de Raleigh (fondo). Las longitudes de onda de excitación superiores a 350 nm pueden reducir la interferencia de fondo porque la mayoría de las sustancias fluorescentes responsables de la fluorescencia de fondo en muestras biológicas se excitan por debajo de 350 nm. Un mayor desplazamiento de Stokes también puede permitir menos interferencia de fondo.

Los fluoróforos generalmente tienen un grupo funcional disponible para la conjugación, ya sea directa o indirectamente con un intermedio de posaconazol, para generar un conjugado de posaconazol que tiene el fluoróforo unido.

Los fluoróforos para uso en ensayos heterogéneos pueden ser relativamente insensibles al estado de unión. Por el contrario, los fluoróforos para usar en un ensayo de homogéneo pueden ser sensibles al estado de unión, es decir, el tiempo de vida de la fluorescencia debe ser alterable por unión de manera que se puedan distinguir las formas unidas y las libres.

Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero sin limitación, derivados de naftaleno (por ejemplo, cloruro de dansilo), derivados de antraceno (por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida de propionato de antraceno), derivados de pireno (por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida de butirato de pireno), derivados de fluoresceína (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína), derivados de rodamina (por ejemplo, isotiocianato de rodamina), ficoeritrina, Rojo Texas y similares.

Enzimas

Como se analiza en este documento, el conjugado de posaconazol puede ser un conjugado marcador (por ejemplo, un fragmento de posaconazol de Fórmula 1 conjugado en este documento con un marcador detectable). En algunos casos, el marcador detectable es un marcador no isotópico, tal como una fracción del generador de señal. En ciertas realizaciones, la fracción generadora de señal es una enzima. En algunos casos, la enzima facilita una reacción que produce un producto de reacción enzimático. En ciertos casos, el producto de reacción enzimático produce una señal detectable. Como tal, en ciertas realizaciones, los métodos de la presente divulgación incluyen inmunoensayos en los que la detección de la presencia de posaconazol en una muestra incluye determinar la presencia de un producto de reacción enzimático del conjugado marcador.

La enzima puede seleccionarse de modo que sea estable para proporcionar una vida útil deseable, por ejemplo, estable cuando se almacena durante un período de tres meses o más, o seis meses o más, a temperaturas que son convenientes para almacenar en el laboratorio, tal como -20° C o superior. La enzima puede seleccionarse de modo que

tenga una tasa de renovación satisfactoria en el pH óptimo o cerca de este para la unión al anticuerpo, que puede tener un pH aproximado de 6 a 10, tal como un pH de 6 a 8. Un producto de la reacción enzimática facilitada por la enzima puede formarse o destruirse como resultado de la reacción enzimática y puede proporcionar un producto de reacción enzimático que absorbe luz en la región ultravioleta o en la región visible, tal como un intervalo de 250-750 nm, incluidos 300-600 nm. La enzima también puede tener un sustrato (incluidos los cofactores), que tiene un peso molecular de 300 o más, o 500 o más. La enzima que se emplea u otras enzimas, con actividad similar, pueden no estar presentes en la muestra a medir, o pueden eliminarse o desactivarse fácilmente antes de la adición de los reactivos de ensayo. Además, la enzima puede seleccionarse para evitar el impacto de cualquier inhibidor de origen natural para la enzima que puede estar presente en las muestras a ensayar o como algún otro componente de la mezcla de reacción.

Aunque se pueden emplear enzimas de peso molecular de 600.000 o más, en algunas realizaciones se emplearán enzimas de relativamente bajo peso molecular, tales como de peso molecular 10.000 a 300.000, incluyendo de un peso molecular de 10.000 a 150.000, o un peso molecular de 10.000 a 100.000. Cuando una enzima tiene una pluralidad de subunidades, los intervalos de peso molecular se refieren a la enzima y no a las subunidades.

Puede ser deseable seleccionar una enzima que sea susceptible de marcación detectable. En algunos casos, la enzima puede marcarse de forma detectable usando marcadores detectables apropiados ejemplificados en este documento.

Ciertas enzimas incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, lisozima, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, β-galactosidasa y ureasa. Además, se puede usar un fragmento genéticamente modificado de una enzima, tal como el fragmento donador y aceptor de β-galactosidasa utilizado en inmunoensayos de CEDIA (véase, por ejemplo, Henderson DR et al., Clin Chem. 32 (9): 1637-1641 (1986)); patente de Estados Unidos No. 4.708.929. Estas y otras enzimas que pueden usarse se discuten en Eva Engvall en Enzyme Immunoassay ELISA y EMIT en Methods in Enzymology, 70: 419-439 (1980) y en la patente de Estados Unidos No. 4.857.453.

En ciertas realizaciones, la enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y está unida a un fragmento de posaconazol, formando así un conjugado de compañero reactivo con posaconazol. Un anticuerpo anti-posaconazol usado junto con tales conjugados de posaconazol puede seleccionarse para unirse específicamente al epítopo de posaconazol presentado por el conjugado de posaconazol-enzima, y así afectar la actividad del conjugado de posaconazol-enzima.

Para los ensayos que emplean conjugados de posaconazol-enzima, como un cierto conjugado de proteína en el que un fragmento de posaconazol se marca con una enzima, el fragmento de posaconazol se puede unir a la enzima por cualquier método adecuado. En ciertas realizaciones, la química descrita aquí para la formación de conjugados de proteína inmunogénica de fragmentos de posaconazol también se usa para preparar el conjugado de posaconazol-enzima. De esta forma, la fracción de posaconazol del conjugado de posaconazol-enzima que se presenta al anticuerpo puede ser sustancialmente similar al epítopo de posaconazol al que se une específicamente el anticuerpo.

El procedimiento de selección se ejemplifica usando un conjugado de compañero reactivo con posaconazol que incluye G6PDH como el compañero reactivo y un fragmento de posaconazol como el hapteno. La primera etapa en la selección de un anticuerpo implica probar la magnitud de la inhibición del anticuerpo de un conjugado de compañero reactivo con posaconazol. En esta etapa, se seleccionan los anticuerpos que inhiben significativamente la actividad enzimática de G6PDH. Los anticuerpos que funcionan bien en la primera prueba se someten luego a una segunda prueba. Aquí, el anticuerpo primero se incuba con posaconazol. A continuación, se agrega el conjugado de compañero reactivo con posaconazol. En ciertas realizaciones, un cierto anticuerpo se puede unir preferentemente a posaconazol en lugar de al conjugado de la pareja reactiva con posaconazol. La reducción en la unión al conjugado de la molécula reactiva con posaconazol puede detectarse como un aumento en la actividad de G6PDH.

Detección

A través de la fluorescencia

Cuando se emplea un analito marcado fluorescentemente (es decir, antígeno o anticuerpo de posaconazol), la fluorescencia emitida puede ser proporcional (directa o inversamente) a la cantidad de analito. La cantidad de fluorescencia puede determinarse por la amplitud de la curva de decaimiento de fluorescencia para la especie fluorescente. En algunos casos, este parámetro de amplitud es directamente proporcional a la cantidad de especies fluorescentes y, por consiguiente, al analito.

En ciertas realizaciones, la medición espectroscópica de la fluorescencia se realiza: (a) excitando el fluoróforo con un pulso de luz; (b) detectando y almacenando una imagen del pulso de excitación y una imagen de toda la fluorescencia (el transiente fluorescente) inducida por el pulso de excitación; (c) digitalizando la imagen; (d) calculando el verdadero transiente fluorescente a partir de los datos digitalizados; y (e) determinando la amplitud del transiente fluorescente como una indicación de la cantidad de especies fluorescentes.

De acuerdo con el método, se mide sustancialmente toda la fluorescencia emitida por la especie fluorescente que llega

al detector en función del tiempo desde el instante de la excitación. Como consecuencia, la señal que se detecta puede ser una superposición de varias señales componentes (por ejemplo, señal de fondo y una señal específica de analito). Como se mencionó, las contribuciones individuales a la fluorescencia global que llega al detector pueden distinguirse en función de las diferentes velocidades de decaimiento de fluorescencia (tiempos de vida) de los componentes de la señal. Para cuantificar la magnitud de cada contribución, los datos de la señal detectados pueden procesarse para obtener la amplitud de cada componente. La amplitud de cada señal componente puede ser proporcional a la concentración de la especie fluorescente.

A través de una enzima

La detección de la cantidad de producto producido por el conjugado de la molécula reactiva con posaconazol de las realizaciones se puede llevar a cabo por varios métodos, tales como, pero sin limitación, colorimetría, fluorescencia y espectrofotometría. Estos métodos de detección se discuten en "Analytical Biochemistry" por David Holme, Addison-Wesley, 1998.

Soportes sólidos

Los conjugados de posaconazol y/o los anticuerpos anti-posaconazol que se usarán como reactivos en un ensayo pueden insolubilizarse por unión a una fase sólida. Esta puede ser, por ejemplo, una pared de un recipiente que contiene el reactivo, a un material en partículas, o a un vehículo de gran peso molecular que puede mantenerse en suspensión pero que puede retirarse por medios fisicoquímicos, tales como centrifugación o microfiltración. En algunos casos, la unión es a través de uno o más enlaces covalentes. La unión no necesita ser covalente, pero debe tener al menos la suficiente permanencia para soportar cualquier técnica de separación (incluidos los lavados) que sean parte del procedimiento del ensayo. Ciertos materiales particulados incluyen agarosa, poliestireno, celulosa, poliacrilamida, partículas de látex, partículas magnéticas y glóbulos rojos fijados. Los ejemplos de matrices disponibles comercialmente incluyen Sepharose® (Pharmacia), resinas Pores® (Roche Molecular Biochemicals), resinas Actigel Superflow^{MR} (Sterogene Bioseparations Inc.) y Dynabeads^{MR} (Dynal Inc.). En ciertas realizaciones, la elección del soporte sólido puede depender de uno o más entre estabilidad, capacidad, accesibilidad del anticuerpo acoplado, velocidad de flujo (o la capacidad de dispersar la resina en la mezcla de reacción) y la facilidad de separación.

Formatos de ensayo

Como se indicó anteriormente, los inmunoensayos para la detección de posaconazol pueden ser de una variedad de formatos. En general, los inmunoensayos implican combinar uno o más reactivos de inmunoensayo (por ejemplo, al menos un anticuerpo anti-posaconazol) con una muestra de ensayo (es decir, una muestra que se sospecha que contiene posaconazol) en una mezcla de reacción. "Mezcla de reacción" generalmente se refiere a la combinación de una muestra sospechosa de contener posaconazol y uno o más reactivos de inmunoensayo como se ejemplifica en la presente divulgación para facilitar la detección de la presencia o ausencia de posaconazol en la muestra, donde la detección puede ser cualitativa o cuantitativa. La mezcla de reacción es usualmente una solución acuosa, aunque el reactivo o reactivos de inmunoensayo pueden estar en solución o inmovilizados en un soporte (por ejemplo, un sustrato tal como una perla). La mezcla de reacción puede incluir otros componentes compatibles con el inmunoensayo, por ejemplo, reguladores, reactivos y similares.

Los inmunoensayos generalmente se clasifican en una de varias formas. Por ejemplo, los inmunoensayos pueden clasificarse de acuerdo con el modo de detección utilizado, es decir, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de radio, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, inmunoensayos de quimioluminiscencia, ensayos turbidimétricos, etc. Otro método de agrupación es de acuerdo con el procedimiento de ensayo utilizado, es decir, formatos de ensayo competitivo, formatos de ensayo de tipo sándwich, así como ensayos basados en los principios de precipitación o aglutinación. En ciertos casos, se hace una distinción adicional dependiendo de si las etapas de lavado están incluidas en el procedimiento (los denominados ensayos heterogéneos) o si la reacción y la detección se realizan sin una etapa de lavado (los denominados ensayos homogéneos). Ciertos ensayos se describen con más detalle a continuación.

Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos

Los inmunoensayos se pueden describir como heterogéneos u homogéneos. "Inmunoensayo homogéneo", como se usa en este documento, se refiere a un método de ensayo donde el complejo no se separa de los componentes de la reacción sin reaccionar, sino que la presencia del complejo se detecta por una propiedad que al menos uno de los reactivos adquiere o pierde como resultado de ser incorporado al complejo. Los ensayos homogéneos incluyen sistemas que implican pares de extinción de fluorocromos y fluorocromos en diferentes reactivos; enzimas y pares de inhibidores de enzimas en diferentes reactivos; cromóforos y pares de modificadores cromóforos en diferentes reactivos; y ensayos de aglutinación de látex.

Un cierto ensayo homogéneo es el inmunoensayo enzimático cuantitativo homogéneo en el que un fragmento de posaconazol está conjugado con una enzima activa. En algunas realizaciones, la conjugación está dispuesta de modo que la unión de un anticuerpo anti-posaconazol al fragmento de posaconazol afecta la actividad enzimática de una

manera cualitativa o cuantitativa. Si una muestra que contiene posaconazol se premezcla con el anticuerpo, el anticuerpo puede formar un complejo con el posaconazol y, por lo tanto, se puede evitar que se una al conjugado enzimático. De esta forma, la actividad de la enzima puede correlacionarse con la cantidad de posaconazol presente en la muestra.

G6PDH es una cierta enzima útil en tales ensayos. En algunas realizaciones, la G6PDH es una variante de una G6PDH de origen natural en la que uno o más residuos de lisina se eliminan o sustituyen, o se introducen uno o más residuos de cisteína. Por ejemplo, G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* son enzimas diméricas que tienen la capacidad de catalizar la oxidación de D-glucosa-6-fosfato a D-glucono-delta-lactona-6-fosfato mediante la utilización de NAD^+ o $NADP^+$. Esta propiedad de usar NAD^+ diferencia estas enzimas de la G6PDH humana, que utiliza solo $NADP^+$ de manera efectiva, y permite medir la actividad de G6PDH específica de *L. mesenteroides* en presencia de G6PDH humana, como por ejemplo en muestras humanas. Dos géneros ciertos de bacterias para seleccionar G6PDH son *Leuconosto* y *Zymomonas*. Dentro de estos géneros, son de interés *L. mesenteroides, L. citreum, L. lactis, L. dextranicum* y *Z. mobilis* son de interés, donde *L. mesenteroides, L. citreum* y *L. lactis* son ejemplos específicos. Otro ejemplo de un sistema de ensayo homogéneo es el inmunoensayo de donador enzimático clonado.

En un ensayo basado en la separación o "heterogéneo", la detección de un complejo de un anticuerpo anti-posaconazol y un analito implica un proceso en el que el complejo formado se separa físicamente del analito sin reaccionar, del anticuerpo sin reaccionar o de ambos.

En un inmunoensayo heterogéneo, un complejo de un anticuerpo anti-posaconazol y un analito puede formarse primero en la fase fluida, y luego capturarse posteriormente mediante un reactivo en fase sólida o separarse sobre la base de una propiedad física o química alterada, tal como por filtración en gel o precipitación. Alternativamente, uno de los reactivos puede unirse a una fase sólida antes de ponerse en contacto con otros reactivos, y luego el complejo puede recuperarse lavando la fase sólida sin reactivos que no hayan reaccionado. Los ensayos basados en separación típicamente implican el uso de un derivado o anticuerpo marcado para facilitar la detección o cuantificación del complejo. Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como ^{125}I, enzimas tales como peroxidasa y β-galactosidasa, y marcadores fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína. La etapa de separación implica eliminar el reactivo marcado presente en forma compleja a partir del reactivo marcado que no ha reaccionado. La cantidad de marcador en el complejo puede medirse directamente o deducirse de la cantidad que no ha reaccionado.

Ensayos tipo sándwich y de competición

Los ensayos de esta divulgación incluyen tanto ensayos tipo sándwich como de competición. Los ensayos en sándwich típicamente implican formar un complejo en el que el analito a medir se intercala entre un reactivo, como un primer anticuerpo utilizado en última instancia para la separación del complejo, y otro reactivo, tal como un segundo anticuerpo utilizado como marcador para el complejo separado. Los ensayos de competición implican un sistema en el que el analito que se va a medir compite con un derivado del analito por la unión a otro reactivo, tal como un anticuerpo. Un ejemplo de un ensayo de competición que usa EMIT® se describe en la patente de Estados Unidos No. 3.817.837.

En algunas realizaciones, el inmunoensayo incluye además añadir un conjugado de posaconazol que tiene una fracción de posaconazol y un marcador detectable con la muestra. La presencia o ausencia de posaconazol en la muestra se puede detectar mediante la detección del marcador detectable. El marcador detectable puede incluir una enzima y la detección puede ser mediante el ensayo de la actividad de la enzima. En ciertas realizaciones, la enzima es una deshidrogenasa, tal como G6PDH.

Cromatografía de flujo lateral

Los compuestos y métodos de las realizaciones también abarcan el uso de estos materiales en tecnologías de cromatografía de flujo lateral. La cromatografía de flujo lateral implica una tira de membrana que incluye un dispositivo de detección, tal como una fracción generadora de señal no isotópica, para posaconazol. A continuación, se puede aplicar una muestra de un paciente a la tira de membrana. La muestra puede interactuar con el dispositivo de detección, produciendo un resultado. Los resultados pueden significar varias cosas, incluida la ausencia de posaconazol en la muestra, la presencia de posaconazol en la muestra o la concentración de posaconazol en la muestra.

Ciertas realizaciones proporcionan un método para determinar cualitativamente la presencia o ausencia de un posaconazol en una muestra, mediante el uso de cromatografía de flujo lateral. En ciertas realizaciones, el diseño básico del dispositivo de flujo lateral cualitativo es el siguiente: 1) La almohadilla de la muestra es donde se aplica la muestra. La almohadilla de muestra se trata con productos químicos tales como reguladores o sales, que, cuando se vuelven a disolver, optimizan la química de la muestra para la reacción con el conjugado, la prueba y los reactivos de control; 2) La almohadilla de liberación de conjugado es típicamente un material de fibra de vidrio o poliéster que se trata con un reactivo conjugado tal como un conjugado de oro coloidal y anticuerpo. Un proceso típico para tratar una almohadilla conjugada es usar impregnación seguido de secado. En uso, la muestra líquida añadida a la prueba volverá a disolver el conjugado para que fluya hacia la membrana; 3) El sustrato de la membrana generalmente está hecho de nitrocelulosa o un material similar en el que los componentes de captura del anticuerpo están inmovilizados; 4) Una almohadilla de mecha se usa en pruebas donde el plasma sanguíneo debe separarse de la sangre completa. Por lo

general, se usa un proceso de impregnación para tratar esta almohadilla con reactivos destinados a acondicionar la muestra y promover la separación celular; 5) La almohadilla absorbente actúa como un depósito para recoger los fluidos que han fluido a través del dispositivo; y 6) Las capas anteriores y el sistema de membrana están laminados sobre un soporte de plástico con material adhesivo que sirve como miembro estructural.

Ciertas realizaciones proporcionan un método para determinar cualitativamente la presencia de un posaconazol en una muestra, mediante el uso de cromatografía de flujo lateral. En estas realizaciones, la tira de membrana incluye una almohadilla de muestra, que es una almohadilla de liberación conjugada (CRP) que tiene un anticuerpo que es específico para el posaconazol. Este anticuerpo puede conjugarse con una fracción generadora de señal no isotópica, tal como una partícula de oro coloidal. Otras fracciones de detección útiles en un entorno de cromatografía de flujo lateral incluyen colorantes, partículas de látex coloreado, partículas de látex marcadas en forma fluorescente, fracciones generadoras de señales no isotópicas, etc. En algunos casos, la tira de membrana incluye además una línea de captura, en la que el fragmento de antígeno posaconazol está inmovilizado en la tira. En algunas realizaciones, esta inmovilización es a través de unión covalente a la tira de membrana, opcionalmente a través de un enlazador. En otras realizaciones, la inmovilización es a través de la unión no covalente a la tira de membrana. En aún otras realizaciones, el fragmento de posaconazol inmóvil en la línea de captura está unido a un compañero reactivo, tal como un transportador inmunogénico tal como BSA.

La muestra de un paciente se puede aplicar a la almohadilla de muestra, donde se puede combinar con el anticuerpo en la CRP, formando así una solución. Esta solución puede migrar cromatográficamente por acción capilar a través de la membrana. Cuando el posaconazol está presente en la muestra, se puede formar un complejo de posaconazol-anticuerpo, que migra a través de la membrana por acción capilar. Cuando la solución alcanza la línea de captura, el complejo posaconazol-anticuerpo puede competir con el posaconazol inmóvil por los sitios de unión limitados del anticuerpo. Cuando hay una concentración suficiente de posaconazol en la muestra, puede llenar los sitios de unión de anticuerpos limitados. En ciertos casos, esto evitará la formación de un complejo coloreado de anticuerpo-posaconazol inmóvil en la línea de captura. Por lo tanto, la ausencia de color en la línea de captura indica la presencia de posaconazol en la muestra.

En ausencia de posaconazol en la muestra, puede formarse un complejo de anticuerpo-posaconazol con coloreado una vez que la solución alcanza la línea de captura de la tira de membrana. En algunos casos, la formación de este complejo en la línea de captura es evidencia de la ausencia de posaconazol terapéutico en la muestra.

Ciertas realizaciones proporcionan un método para determinar cuantitativamente la cantidad de posaconazol en una muestra, mediante el uso de cromatografía de flujo lateral. Esta tecnología se describe adicionalmente en las patentes de Estados Unidos Nos. 4.391.904; 4.435.504; 4.959.324; 5.264.180; 5.340.539; y 5.416.000. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede inmovilizarse a lo largo de toda la longitud de la tira de membrana. En general, si la tira de membrana está hecha de papel, el anticuerpo puede unirse covalentemente a la tira de membrana. Si la tira de membrana está hecha de nitrocelulosa, entonces el anticuerpo puede unirse no covalentemente a la tira de membrana a través, por ejemplo, de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La tira de membrana puede incluir una CRP que incluye el posaconazol unido a una fracción detectora. En ciertas realizaciones, la fracción detectora es una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP).

En ciertas realizaciones, la muestra de un paciente se aplica a la tira de membrana, donde se puede combinar con la molécula de posaconazol/detector en la CRP, formando así una solución. Esta solución puede migrar cromatográficamente por acción capilar a través de la membrana. Cuando el posaconazol está presente en la muestra, tanto la muestra de posaconazol como la molécula de posaconazol/detector compiten por los sitios de unión limitados del anticuerpo. Cuando está presente una concentración suficiente de posaconazol en la muestra, puede llenar los sitios limitados de unión de anticuerpos. En algunos casos, esto fuerza a la molécula de posaconazol/detector a seguir migrando en la tira de la membrana. Cuanto menor es la distancia de migración de la molécula de posaconazol/detector en la tira de membrana, menor es la concentración de posaconazol en la muestra, y viceversa. Cuando la molécula de posaconazol/detector incluye una enzima, la longitud de migración de la molécula de posaconazol/detector puede detectarse aplicando un sustrato de enzima a la tira de membrana. La detección del producto de la reacción enzimática se puede utilizar para determinar la concentración de posaconazol en la muestra. En ciertas realizaciones, el sustrato productor de color de la enzima, tal como una N,N-dimetilanilina modificada, se inmoviliza en la tira de membrana y la 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona se aplica pasivamente a la membrana, aliviando así la necesidad de un reactivo separado para visualizar la reacción de producción de color.

Inmunoensayo de polarización de fluorescencia para posaconazol

La tecnología de inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) se basa en la unión competitiva entre un antígeno/fármaco en una muestra y una concentración conocida de antígeno/fármaco marcado. La tecnología de FPIA se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 4.593.089, 4.492.762, 4.668.640 y 4.751.190. Los reactivos, sistemas y equipos de FPIA se pueden usar con anticuerpos anti-posaconazol que también son anticuerpos análogos de anti-posaconazol.

La tecnología FPIA se puede usar para identificar la presencia de posaconazol y se puede usar en ensayos que

cuantifican la cantidad de posaconazol en una muestra. En parte, las propiedades de rotación de las moléculas en solución permiten que el grado de polarización sea directamente proporcional al tamaño de la molécula. En consecuencia, la polarización puede aumentar a medida que aumenta el tamaño molecular. Es decir, cuando se usa luz polarizada linealmente para excitar un posaconazol marcado con fluorescencia u otro marcado en forma luminiscente o fragmento del mismo, que es pequeño y gira rápidamente en solución, la luz emitida puede despolarizarse significativamente. Cuando el posaconazol o fragmento marcado con fluorescencia interactúa con un anticuerpo o está unido a él, la rotación puede ralentizarse y la luz emitida puede estar altamente polarizada. En algunos casos, esto se debe a que el anticuerpo aumenta de forma significativa y medible el tamaño del complejo. Además, aumentar la cantidad de posaconazol no marcado en la muestra puede dar como resultado una unión disminuida del posaconazol o fragmento marcados con fluorescencia por el anticuerpo anti-posaconazol, y de ese modo disminuir la polarización de la luz emitida por la muestra. La relación cuantitativa entre la polarización y la concentración del posaconazol no marcado en la muestra se puede establecer midiendo los valores de polarización de las calibraciones con concentraciones conocidas de posaconazol. Por lo tanto, FPIA puede usarse para identificar la presencia y concentración de posaconazol en una muestra.

En algunas realizaciones, el ensayo implica un sistema de ensayo de FPIA. Un ejemplo de componentes del sistema FPIA puede incluir lo siguiente: i) anticuerpos anti-posaconazol monoclonales o policlonales capaces de unirse específicamente a posaconazol y un fragmento de posaconazol; ii) una muestra que se sospecha de contener el posaconazol; y iii) fragmento de posaconazol marcado con una fracción fluorescente, tal como fluoresceína. Alternativamente, el sistema se puede proporcionar como un kit exclusivo de la muestra. Adicionalmente, el sistema puede incluir diversas composiciones reguladoras, composiciones de gradiente de concentración de posaconazol o una composición madre de posaconazol y similares.

Inmunoensayo de micropartículas homogéneas para posaconazol

La tecnología de inmunoensayo de micropartículas homogéneas ("HMI"), que se puede denominar ensayos inmunoturbidimétricos, se basa en la aglutinación de partículas y compuestos en solución. Cuando las partículas y/o compuestos químicos se aglutinan, los tamaños de partícula pueden aumentar y aumentar la turbidez de una solución. En consecuencia, los anticuerpos anti-posaconazol pueden usarse con micropartículas y fragmentos de posaconazol para evaluar la presencia, y opcionalmente la cantidad, de posaconazol en una muestra. La HMI puede ser útil porque los inmunoensayos se pueden realizar en sangre, hemolizado sanguíneo, suero, plasma, tejido y/u otras muestras. Los ensayos de HMI pueden configurarse para realizarse con posaconazol y/o un fragmento de posaconazol cargado en una micropartícula, o con un anticuerpo anti-posaconazol cargado en una micropartícula. Los ensayos inmunoturbidimétricos o HMI se usan para medir la aglutinación de sustancias en una muestra.

Las tecnologías de ensayos inmunoturbidimétricos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.571.728, 4.847.209, 6.514.770 y 6.248.597. Dichos ensayos implican métodos de atenuación de luz, nefelométricos o turbidimétricos. La formación de un compuesto AB aglutinado a partir del posaconazol (A) y la pareja de unión a micropartículas de anticuerpo anti-posaconazol (B) puede medirse por el cambio que ocurre en la dispersión o absorción de la luz incidente dirigida a la muestra. Alternativamente, el anticuerpo anti-posaconazol (A) se puede unir con un posaconazol o una micropartícula cargada derivada (B). Cuando se usan partículas suspendibles que tienen una pareja de unión inmovilizada, puede haber una potenciación de los efectos, lo que puede facilitar la determinación de concentraciones más bajas de posaconazol. Estos métodos homogéneos se pueden llevar a cabo de manera rápida y sencilla, y pueden facilitar la automatización de análisis de muestra como se describe con más detalle a continuación.

Inmunoensayos de donadores enzimáticos clonados para posaconazol

Inmunoensayos de donadores enzimáticos clonados ("CEDIA®", Roche Diagnostics), que se basan en la competencia de posaconazol en la muestra biológica con un conjugado de posaconazol que contiene un fragmento inactivo de donador de enzima ("ED") genéticamente modificado tal como β-D-galactósido galactohidrolasa o β-galactosidasa ("β-gal") de *E. coli*, para unirse a un anticuerpo capaz de unirse a posaconazol. Si el posaconazol está presente en la muestra, puede unirse al anticuerpo, dejando la porción de ED del conjugado derivado de ED libre para restablecer la actividad enzimática de β-D-galactósido galactohidrolasa o β-gal en la mezcla de reacción para poder asociarse con fragmentos aceptores de enzimas ("EA"). La enzima activa, que incluye ED y EA, puede ser capaz de producir un producto de reacción cuantificable cuando se expone a un sustrato apropiado. Un ejemplo de un sustrato es rojo de clorofenol-β-D-galactopiranósido ("CPRG"), que puede escindirse mediante la enzima activa en galactosa y CPR, donde la CPR se mide por absorbencia a una longitud de onda de aproximadamente 570 nm. Si el posaconazol no está presente en la muestra, el anticuerpo se puede unir al conjugado derivado de ED, inhibiendo así la asociación de los fragmentos ED con los fragmentos EA e inhibiendo la restauración de la actividad enzimática. La cantidad de producto de reacción y el cambio de absorbancia resultante son proporcionales a la cantidad de posaconazol en la muestra.

Inmunoensayos heterogéneos quimioluminiscentes para posaconazol

También se puede usar un ensayo competitivo que usa inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes ("CMIA") para evaluar si está presente o no posaconazol en una muestra. Se pueden usar varios tipos de tecnologías CMIA para determinar la presencia y/o cantidad de una entidad química en una muestra. Los ensayos de CMIA pueden incluir el

uso de anticuerpos anti-posaconazol, que son capaces de unirse al posaconazol y sus fragmentos, que están acoplados a partículas, tales como partículas magnéticas o partículas adecuadas para la separación por filtración, sedimentación y/u otros medios. Además, se puede usar un trazador, que puede incluir un fragmento de posaconazol unido a una fracción quimioluminiscente adecuada, para competir con posaconazol libre en la muestra del paciente por la cantidad limitada de anticuerpo anti-posaconazol en la partícula. Después de que la muestra, el trazador y las partículas de anticuerpo interactúan y una etapa de lavado rutinario ha eliminado el trazador no unido, la cantidad de trazador unido a las partículas de anticuerpo puede medirse por quimioluminiscencia, donde la quimioluminiscencia se expresa en unidades relativas de luz (RULE). La cantidad de quimioluminiscencia está inversamente relacionada con la cantidad de fármaco libre en la muestra del paciente y la concentración se determina mediante la construcción de una curva estándar usando los valores conocidos del fármaco.

Otros inmunoensayos para posaconazol

Los fragmentos, conjugados, anticuerpos, inmunógenos y/u otros conjugados de posaconazol descritos en la presente memoria también son adecuados para cualquiera de una serie de otros inmunoensayos heterogéneos con una gama de sistemas de detección que incluyen, pero no se limitan a inmunoensayos enzimáticos o fluorescentes, y/o homogéneos que incluyen, pero no se limitan a, ensayos de flujo lateral rápido, y matrices de anticuerpos, así como formatos aún por desarrollar.

Aunque se han descrito en este documento diversos ensayos de inmunodiagnóstico que utilizan los fragmentos, conjugados, anticuerpos, inmunógenos y/o trazadores de posaconazol, tales ensayos también se pueden modificar como es bien conocido en la técnica. Como tal, pueden realizarse diversas modificaciones de etapas o actos para realizar tales inmunoensayos dentro del alcance de las realizaciones.

Kits

La presente divulgación también proporciona kits que encuentran uso en la práctica de los métodos en cuestión, como se describió anteriormente, tales como un método para realizar un ensayo para la determinación de posaconazol en una muestra. Los kits de las realizaciones pueden incluir un anticuerpo anti-posaconazol en un recipiente, y pueden incluir un conjugado de posaconazol (por ejemplo, para uso en un ensayo de unión competitiva, para uso en un ensayo basado en enzimas, y similares). Por ejemplo, un kit de inmunoensayo puede incluir al menos un anticuerpo para un inmunógeno de un analito, por ejemplo, posaconazol, y al menos un conjugado enzimático que corresponde a ese analito, por ejemplo, un conjugado enzimático de un fragmento de posaconazol. En ciertas realizaciones, un kit para un ensayo para el analito posaconazol incluye en combinación empacada: (i) un anticuerpo producido contra el compuesto de Fórmula 1 anterior; y (ii) un conjugado de un fragmento del analito.

Los reactivos y reguladores utilizados en los ensayos se pueden envasar por separado o en combinación en forma de kit para facilitar la distribución. Los reactivos pueden proporcionarse en contenedores adecuados, y pueden proporcionarse en un empaque junto con instrucciones escritas relacionadas con los procedimientos de ensayo (por ejemplo, instrucciones para un ensayo para detectar posaconazol en una muestra). Por ejemplo, los reactivos del kit pueden proporcionarse en una combinación empacada, en el mismo recipiente o en recipientes separados, en forma líquida o liofilizada de manera que la relación de los reactivos proporcione una optimización sustancial del método y el ensayo. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o varios reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos.

El kit puede incluir además otros reactivos empacados por separado para llevar a cabo un ensayo tal como miembros de sbp adicionales, reactivos auxiliares tales como un sustrato de enzima auxiliar, y otros. Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que deben producirse durante el presente procedimiento y además optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, generalmente liofilizado, incluidos excipientes, que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con la presente invención.

Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en un ensayo de acuerdo con las realizaciones. En ciertas realizaciones, los reguladores y/o estabilizadores están presentes en los componentes del kit. En ciertas realizaciones, los kits incluyen soluciones indicadoras o indicadores de "tiras reactivas", secantes, medios de cultivo, cubetas y similares. En ciertas realizaciones, los kits incluyen cartuchos indicadores (donde un componente del kit está unido a un soporte sólido) para su uso en un detector automático. En ciertas realizaciones, se pueden incluir proteínas adicionales, tales como albúmina o tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos. En ciertas realizaciones, los kits incluyen un manual de instrucciones que enseña un método de las realizaciones y/o describe el uso de los componentes del kit. Por ejemplo, las realizaciones del kit pueden incluir: (a) un anticuerpo generado contra un fragmento de posaconazol; (b) reactivos auxiliares para determinar el compuesto (como se describe en este documento); y (c) un conjugado marcado de un compuesto de Fórmula 1 anterior.

Las realizaciones de la presente divulgación también incluyen un kit para determinar convenientemente la presencia o la

ausencia de posaconazol en una muestra. El kit puede incluir un anticuerpo anti-posaconazol y un estándar de calibración de posaconazol. El estándar de calibración de posaconazol puede incluir patrones de calibración y control útiles para realizar el ensayo. Los kits también pueden incluir opcionalmente un conjugado que incluye una fracción de posaconazol y un marcador detectable. En ciertas realizaciones, un marcador detectable del conjugado es una enzima. En algunas realizaciones, la enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). En algunas realizaciones, la G6PDH es una variante de una G6PDH de origen natural en la que uno o más residuos de lisina se eliminan o sustituyen, o se introducen uno o más residuos de cisteína.

Utilidad

Los compuestos, métodos y kits de la presente divulgación encuentran uso en la monitorización de fármacos terapéuticos de rutina de posaconazol mediante inmunoensayos. En ciertas realizaciones, estos inmunoensayos proporcionan pruebas automatizadas simples adaptadas a equipos de laboratorio estándar con un tiempo de respuesta rápido. Como se describe en este documento, para proporcionar tales inmunoensayos, se producen anticuerpos específicos para posaconazol. Los fragmentos e inmunógenos están diseñados para impartir a través de los anticuerpos correspondientes una reactividad específica producida al posaconazol.

Esquemas generales de síntesis

En ciertas realizaciones, el fragmento POS-IV de posaconazol se puede producir como se muestra en la Fig. 3 del compuesto (9) y compuesto (7). El compuesto (9) se hace reaccionar con el compuesto (7) para producir el compuesto (10). El compuesto (10) se trata con LiOH para producir el fragmento POS-IV de posaconazol. POS-IV puede purificarse antes de continuar con la siguiente etapa.

Como se muestra en la Fig. 4, el grupo ácido del compuesto POS-IV se puede convertir en un éster de N-hidroxisuccinimida (compuesto (12)) y unirse a través del nitrógeno a una proteína para producir POS-IV KLH o un marcador para producir POS-IV G6PDH, respectivamente. Por ejemplo, el fragmento POS-IV de posaconazol purificado puede hacerse reaccionar con NHS (N-hidroxisuccinimida) en presencia de una carbodiimida para preparar un éster reactivo con aminas del grupo carboxilato para el marcado químico. El éster de NHS semiestable resultante puede reaccionar luego con aminas primarias ($-NH_2$) presentes en proteínas o la enzima marcadora para formar enlaces cruzados de amida.

Los inmunógenos preparados con el fragmento POS-IV de posaconazol pueden proporcionar anticuerpos que reaccionan específicamente con posaconazol. Los anticuerpos que son específicos de posaconazol se pueden utilizar para diferentes formatos de inmunoensayo como se describe en este documento.

Preparación de anticuerpos

El siguiente método se puede emplear para preparar anticuerpos policlonales usando los inmunógenos de la Fórmula 1. Los anticuerpos que contienen antisuero se pueden obtener mediante la inmunización de un animal, tal como conejos y ovejas, con un inmunógeno apropiado y la obtención de antisueros a partir de la sangre del animal inmunizado después de un período de espera apropiado. Las revisiones de la preparación de anticuerpos son proporcionadas por Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., EE.UU., 1976), Butler, J. Immunol. Meth. 7: 1-24 (1975); Broughton y Strong, Clin. Chem. 22: 726-732 (1976); y Playfair, et al., Br. Med. Bull. 30: 24-31 (1974).

El siguiente procedimiento se puede emplear para preparar anticuerpos monoclonales para los inmunógenos de Fórmula 1. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir de acuerdo con las técnicas estándar de Kohler y Milstein, Nature 265: 495-497, 1975. Las revisiones de las técnicas de anticuerpos monoclonales se encuentran en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980), y Methods of Enzymology 73 (Parte B): 3-46 (1981). En algunos casos, se inyectan muestras de una preparación de inmunógeno apropiada en un animal tal como un ratón y, después de un tiempo suficiente, se sacrifica al animal y se obtienen células del bazo. Alternativamente, las células del bazo de un animal no inmunizado pueden sensibilizarse con el inmunógeno *in vitro*. Los cromosomas de células del bazo que codifican las secuencias de bases para las inmunoglobulinas deseadas se pueden comprimir fusionando las células del bazo, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol, con una línea celular de mieloma. En ciertos casos, las células resultantes, que incluyen hibridomas fusionados, se dejan crecer en un medio selectivo, tal como medio HAT, y las células inmortalizadas sobrevivientes se cultivan en dicho medio usando condiciones de dilución limitante. Las células pueden cultivarse en un recipiente adecuado, por ejemplo, pozos de microtitulación, y el sobrenadante seleccionado para detectar anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada.

Existen diversas técnicas para potenciar los rendimientos de anticuerpos monoclonales, tales como la inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped mamífero, que acepta las células, y la recolección del fluido de ascitis. Cuando una cantidad insuficiente del anticuerpo monoclonal se acumula en el fluido de ascitis, el anticuerpo se puede recoger de la sangre del huésped. Alternativamente, la célula que produce el anticuerpo deseado puede cultivarse en un dispositivo de cultivo de células de fibra hueca o en un dispositivo de matraz giratorio. Existen

diversas formas convencionales para el aislamiento y la purificación de los anticuerpos monoclonales de otras proteínas y otros contaminantes (véase Kohler y Milstein, citado más arriba).

Los anticuerpos se pueden purificar mediante técnicas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía DEAE, cromatografía ABx, y similares, filtración, y así sucesivamente. Los anticuerpos pueden cribarse usando cualquiera de varias técnicas, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se ilustra en las Figs. 5a y 5b, y considerando propiedades tales como especificidad, inhibición conjugada, tamaño de curva y reactividad cruzada.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación completa y descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretende representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados Celsius, y la presión esta en o cerca a la atmosférica.

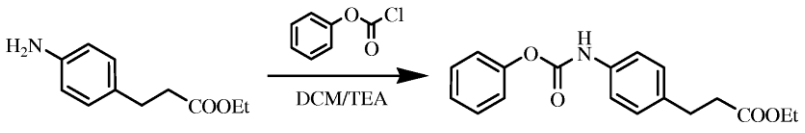
Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. Debería ser evidente que la presente divulgación puede incluir realizaciones adicionales no ilustradas, mediante ejemplos. Además, se han llevado a cabo ciertos ejemplos usando el fragmento POS-IV, antígenos, inmunógenos y anticuerpos anti-POS-IV preparados de acuerdo con la presente divulgación.

Detalles experimentales

La cromatografía analítica en capa fina (TLC) se realizó en placas con respaldo de vidrio Analtech Uniplate Sílica Gel GF (0,25 mm) usando el disolvente especificado. Las manchas en TLC se visualizaron mediante luz ultravioleta (onda corta y/o larga) y/o vapores de yodo. La cromatografía ultrarrápida se llevó a cabo en gel de sílice Whatman de 60 Å (malla 230-400). Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma, Aldrich, Fluka o Lancaster y se utilizaron tal como se recibieron. Los espectros de RMN H y RMN C se registraron en un espectrómetro Bruker Ultrashiel^{MR}-400 (400 MHz). Los desplazamientos químicos se reportaron en partes por millón (ppm, δ, y se relacionaron con tetrametilsilano o con disolvente deuterado como referencia interna). Las abreviaturas de RMN utilizadas son s (singlete), d (doblete) y m (multiplete).

Ejemplo 1. Preparación de ácido 3-(4-(1-((2S,3S)-2-hidroxipentan-3-il)-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-4-(5H)-il)fenil)propanoico (POS-IV)

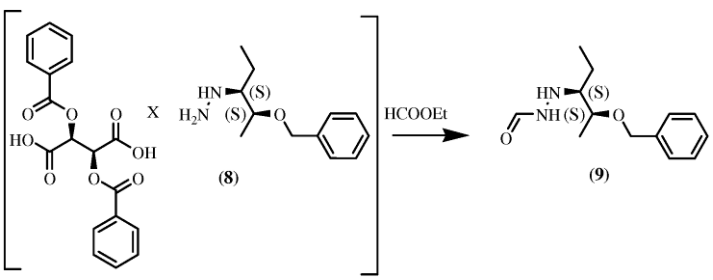
Etapa 1.



(6) (7)

A una solución de 3-(4-aminofenil)propanoato de etilo (4 g, 20,7 mmol) en 40 mL de diclorometano se le añadió carbono clorhidrato de fenilo (3,2 g, 20,7 mmol) a 0°C, seguido de trietilamina (2,1 g , 20,7 mmol). La solución de reacción se agitó a 0°C durante 1 h. La solución de reacción se lavó con salmuera, la capa orgánica se separó y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y el filtrado se concentró para producir el producto deseado (5,8 g, 91% de rendimiento) que se usó en la siguiente etapa sin purificación.

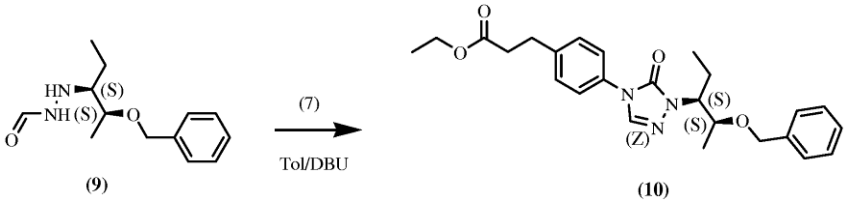
Etapa 2



Sal del ácido 1-((2S,3S)-2-(benciloxi)pentan-3-il)hidracina (2S,3S)-2,3-bis(benzoiloxi)succínico (4 g, 7,0 mmol)

suspendida en 40 mL de formato de etilo, la mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas. La solución se diluyó con acetato de etilo (100 mL) y se lavó con solución acuosa de bicarbonato sódico y salmuera, la capa orgánica se separó y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y el filtrado se concentró para producir N'-((2S,3S)-2-(benciloxi)pentan-3-il) formohidracida (compuesto (9), 1,3 g) que se usó directamente en la siguiente etapa.

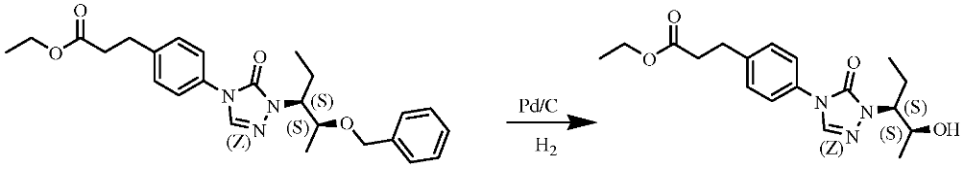
Etapa 3.



(9) (10)

[0216] A una solución de N'-((2S,3S)-2-(benciloxi)pentan-3-il)formohidracida (compuesto (9), 2.5 g, 10.6 mmol) y 3-(4-(fenoxicarbonil)fenil propanoato de etilo (compuesto (7), 3,3 g, 10,6 mmol) en tolueno (30 mL) se le añadieron dos gotas de DBU. La solución resultante se calentó a reflujo durante 24 horas. La solución de reacción se concentró y el residuo se purificó sobre gel en columna de sílice para producir 3-(4-(1-((2S,3S)-2-(benciloxi)pentan-3-il)-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-4(5H)-il) fenil)propanoato de etilo (compuesto (10), 2,8 g, 60% de rendimiento).

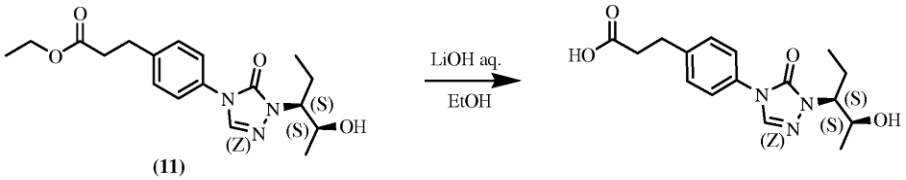
Etapa 4.



(10) (11)

Una mezcla de 3-(4-(1-((2S,3S)-2-(benciloxi)pentan-3-il)-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-4(5H)-il)fenil)propanoato de etilo, (compuesto (10), 2,8 g, 6,4 mmol) y Pd/C (10%, 300 mg, 50% en húmedo) en 30 mL de metanol se agitó en H_2 (760 psi) a 50ºC por 5 horas. La reacción se filtró y el filtrado se concentró para producir 3-(4-(1-((2S,3S)-2-hidroxipentan-3-il)-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-4(5H)-il)fenil)propanoato de etilo (compuesto (11), 2,0 g, 90% de rendimiento)

Etapa 5



(11) POS-IV

A una solución de 3-(4-(1-((2S,3S)-2-hidroxipentan-3-il)-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-4-(5H)-il)fenil)propanoato de etilo (compuesto (11), 2,0 g, 5,8 mmol) en 10 mL de etanol se le añadió solución acuosa de LiOH 2N (5,8 mL, 11,6 mmol). La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 30 mL de agua y la solución acuosa se lavó con acetato de etilo. La capa acuosa se acidificó con HCl a pH 2 y luego se extrajo con acetato de etilo, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El sólido obtenido se recristalizó en acetato de etilo y éter de petróleo (acetato de etilo al 20% en éter de petróleo) para producir ácido 3-(4-(1-((2S,3S)-2-hidroxipentan-3-il)-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-4-(5H)-il)fenil)propanoico puro (compuesto (POS-IV), 800 mg, 43% de rendimiento).

Ejemplo 2. Preparación hapteno activado (Compuesto 12)

A DMF seco (250 µL) se le añadió EDAC (6,59 mg, 0,0344 mmol) y se disolvió. La solución de EDAC se añadió al compuesto de hapteno (POS-IV) (9,17 mg, 0,0287 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante aproximadamente 30 minutos. Se añadió N-hidroxisuccinimida (NHS) (4,12 mg, 0,0358 mmol) en DMF (50 µL) a la solución de EDAC/hapteno (POS-IV). La mezcla se agitó durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La formación de éster se controló por análisis de TLC. El hapteno activado (12) se usó en la siguiente reacción. Véase la Fig. 4.

Ejemplo 3. Preparación de conjugado enzimático (POS-IV G6PDH)

Se centrifugó G6PDH (USB, Santa Clara, CA) suspendida en sulfato de amonio durante 15 min a 12,000 rpm. El sedimento resultante se reconstituyó con regulador de fosfato (12,5 mM, pH 7,2). La solución se dializó durante 2 días a 4ºC frente a regulador de fosfato (12,5 mM, pH 7,2) con tres veces de intercambio de regulador. Después de la diálisis, la solución de enzima se transfirió a un vial de reacción y se ajustó el pH de la solución a 8,7 con regulador de bicarbonato de sodio (0,4 M, pH 9,4) en presencia de glucosa-6-fosfato (G6P, 4,5 mg/mg de G6PDH) y NADH (9 mg/mg de G6PDH) para la siguiente reacción.

Se añadió hapteno activado (12) en cantidades de 5 a 10 µL a una solución de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, pH 8,7) a temperatura ambiente. Después de la adición de cada porción de solución del compuesto (12), se tomó una alícuota de 2 µL y se diluyó 1: 500 con regulador enzimático. Se ensayó una alícuota de 3 µL de esta mezcla de conjugación diluida para la actividad enzimática similar a la descrita en el Ejemplo 7 a continuación. La reacción se controló y se detuvo a aproximadamente el 65% de desactivación de la actividad enzimática. La mezcla se desaló con Sephadex G-25 empacada previamente con PD-10 (Pharmacia, Inc.) y se equilibró previamente con regulador HEPES (10 mM, pH 6,9, EDTA 1 mM). La mezcla de reacción se aplicó a la columna y las fracciones de proteína se reunieron para producir una solución de conjugado (POS-IV G6PDH). Véase la Fig. 4.

Ejemplo 4. Preparación de inmunógeno de KLH (POS-IV-KLH)

Se reconstituyeron dos viales de KLH liofilizado (Pierce, Rockford, IL) con agua desionizada cada uno y se combinaron, y se transfirieron a un vial de reacción. El pH de la solución de KLH se ajustó a 8,7 con regulador de bicarbonato sódico (0,4 M, pH 9,4). La solución del compuesto (POS-IV) se añadió lentamente (10-20 µL por adición) a la solución de KLH durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Después de que se completara la adición, la mezcla se agitó en una cámara fría a 4ºC durante la noche. Esta solución luego se dializó frente a tres cambios de regulador HEPES (10 mM, pH 6,9, 1 mM) para producir inmunógeno (POS-IV KLH). Véase la Fig. 4.

Ejemplo 5. Preparación de anticuerpos policlonales para posaconazol

Se prepararon sueros policlonales de 6 conejos vivos inyectando seis animales con inmunógeno (POS-IV KLH). Esta formulación inmunogénica incluía 200 µg del inmunógeno para la primera inmunización y 100 µg para todas las inmunizaciones posteriores. Independientemente de la cantidad de inmunógeno, la formulación se diluyó a 1 mL con solución salina estéril. Esta solución se mezcló a fondo con 1 mL del adyuvante apropiado: adyuvante completo de Freund para la primera inmunización o adyuvante incompleto de Freund para las inmunizaciones posteriores. La emulsión estable se inyectó posteriormente por vía subcutánea con una aguja de 19 x 1 1/2 en conejos blancos de Nueva Zelanda. Las inyecciones se realizaron a intervalos de 3-4 semanas. Se tomaron muestras de sangre de los conejos inmunizados de la arteria central de la oreja usando una aguja de 19 x 1. La sangre se dejó coagular a 37°C durante la noche, después de lo cual se vertió el suero y se centrifugó. Se añadieron conservantes para formar el material de anticuerpo policlonal. Los anticuerpos policlonales de conejo para posaconazol producidos por el procedimiento anterior inmunizado con inmunógeno (POS-IV KLH) se designaron como composiciones Ab15419, Ab15420, Ab15421, Ab15422, Ab15423 y Ab15424.

El antisuero tomado el día 91 desde el comienzo de la inmunización de la composición de anticuerpo policlonal de conejo Ab15421 se usó en los Ejemplos 8 y 9 a continuación.

Se usó la composición de anticuerpo policlonal de conejo Ab15421 para medir la actividad enzimática, generar una curva de calibración y evaluar la precisión, exactitud y especificidad del ensayo. Se añadió composición de anticuerpo policlonal de conejo Ab15421 al diluyente de anticuerpo para preparar el reactivo de anticuerpo. El reactivo de anticuerpo incluía la composición de anticuerpo policlonal de conejo Ab15421 preparada anteriormente, regulador, estabilizadores, conservantes y los sustratos para la enzima conjugada dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) y glucosa-6-fosfato. Se añadió conjugado enzimático POS-IV G6PDH al reactivo conjugado para preparar el reactivo conjugado enzimático. El reactivo conjugado enzimático incluía conjugado, regulador, estabilizadores y conservantes. El conjugado de enzima POS-IV G6PDH se usó con la composición de anticuerpo policlonal de conejo Ab15421 en los Ejemplos 8 y 9 a continuación.

Ejemplo 6. Preparación de anticuerpos monoclonales para posaconazol

Se prepararon anticuerpos monoclonales usando procedimientos de hibridoma estándar como se describe en detalle (Kohler, G. et al., Nature 256: 495-497 (1976); Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Boca Raton, FL (1982). Las células de hibridoma se inmunizaron con el inmunógeno POS-IV KLH. Esta técnica de hibridoma es generalmente aplicable para producir anticuerpos monoclonales para los fragmentos de posaconazol como se describe en la presente memoria. Un anticuerpo monoclonal para posaconazol producido por el procedimiento anterior con inmunógeno POS-IV KLH se designó como anticuerpo monoclonal # 7. El anticuerpo monoclonal # 7 se usó en los ejemplos 10 y 11 a continuación.

Se usó el anticuerpo monoclonal # 7 para medir un cambio sustancial en la actividad de la enzima, generar una curva de

calibración y evaluar la precisión, exactitud y especificidad del ensayo. El anticuerpo se añadió al diluyente de anticuerpo para preparar el reactivo de anticuerpo. El reactivo de anticuerpo consistió en anticuerpo tal como se preparó anteriormente, regulador, estabilizantes, conservantes y los sustratos para conjugado enzimático de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y glucosa-6-fosfato. Se añadió conjugado enzimático que incluía el compuesto POS-IV G6PDH en el diluyente conjugado para preparar el reactivo conjugado enzimático. El reactivo conjugado enzimático incluía el conjugado, regulador, estabilizadores y conservantes. El conjugado enzimático POS-IV G6PDH se usó con el anticuerpo monoclonal # 7 en los Ejemplos 10 y 11 a continuación. Esta técnica es generalmente aplicable para producir anticuerpos monoclonales para derivados de posaconazol y evaluar su utilidad.

Ejemplo 7. Ensayo para la detección de Posaconazol

Se emplearon anticuerpos de posaconazol y conjugados enzimáticos de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación en ensayos para la detección de posaconazol.

Se añadieron anticuerpos de posaconazol (por ejemplo, composición de anticuerpo policlonal Ab15421 o anticuerpo monoclonal # 7) en el diluyente de anticuerpo para preparar el reactivo de anticuerpo. El reactivo de anticuerpos incluía anticuerpos de posaconazol preparados anteriormente, regulador, estabilizantes, conservantes y los sustratos para el conjugado enzimático NAD^+ y glucosa-6-fosfato. Se añadió conjugado enzimático POS-IV G6PDH o una proteína marcadora que incluye fosfatasa alcalina, β-galactosidasa y peroxidasa de rábano picante al reactivo conjugado para preparar el reactivo conjugado enzimático. El reactivo conjugado enzimático incluía al conjugado, regulador, estabilizadores y conservantes.

Los anticuerpos de posaconazol y los conjugados enzimáticos se usaron en un formato de ensayo homogéneo para detectar muestras de posaconazol. Se incubó una muestra que contenía posaconazol con reactivo de anticuerpo seguido de la adición del reactivo conjugado enzimático. La actividad del conjugado enzimático disminuyó al unirse al anticuerpo de posaconazol. El conjugado enzimático, que no estaba unido al anticuerpo de posaconazol, catalizó la oxidación de la glucosa-6-fosfato (G6P). La oxidación de G6P se acopló con la reducción de NAD^+ a NADH, que se midió a 340 nm. El cambio en la absorbancia a 340 nm se midió espectrofotométricamente. La concentración de posaconazol en una muestra se midió en términos de actividad de G6PDH. El aumento en la velocidad a 340 nm se debió a la formación de NADH y fue proporcional a la actividad del conjugado enzimático. Se generó una curva de ensayo usando posaconazol añadido en suero negativo para posaconazol. La velocidad del ensayo aumentó con el aumento de la concentración de fármaco libre en la muestra.

Ejemplo 8. Curva de calibración

Se disolvió posaconazol en metanol para producir una solución madre de 1000 µg/mL. El suero humano agrupado se dividió en alícuotas en porciones de 10 mL. Se añadió una solución madre de posaconazol a las alícuotas de suero humano en la preparación de una serie de concentraciones conocidas de calibradores de posaconazol que varían de 0 a 16 µg/mL. El ensayo se realizó usando el reactivo conjugado enzimático NB051: 154 que contenía el conjugado POS-IV G6PDH y el reactivo anticuerpo NB051:154 que contenía la composición del anticuerpo policlonal Ab15421. Las curvas de calibración se generaron en el analizador químico clínico automatizado HITACHI 917, como se describe en el Ejemplo 7 midiendo cada nivel por duplicado. Un ejemplo de estas velocidades de calibrador se muestra en la Tabla 1 y el gráfico se muestra en la Fig. 6.

Tabla 1: Velocidades de la curva de calibración

Concentración de posaconazol (mg/mL)	Promedio de velocidad de reacción (mA/min) de duplicados
0,0	129,8
1,0	165,7
2,0	235,5
4,0	304,7
8,0	371,7
16,0	409,4

Como se muestra en la Tabla anterior, la diferencia en la velocidad de reacción para los anticuerpos policlonales a una concentración de posaconazol de 0 µg/mL en comparación con la velocidad de reacción a 16 µg/mL, fue 279,6 mA/min, que fue mayor que la diferencia observada para el anticuerpo monoclonal descrito a continuación en el Ejemplo 10.

Ejemplo 9. Especificidad del inmunoensayo en presencia de otros antifúngicos azólicos.

Al suero humano negativo para azoles antifúngicos se añadió posaconazol disuelto en metanol para lograr una concentración de 10 µg/mL de posaconazol. A una segunda muestra se añadió fluconazol disuelto en metanol para lograr una concentración de 10 µg/mL de fluconazol. De manera similar, itraconazol y voriconazol disueltos en metanol se agregaron a una tercera y cuarta muestra, respectivamente, para lograr una concentración de 10 µg/mL en cada muestra.

El ensayo se calibró como se describe en el Ejemplo 8 usando el reactivo conjugado enzimático NB051: 154 que contiene el conjugado POS-IV G6PDH y el reactivo anticuerpo NB051: 154 que contiene la composición de anticuerpo policlonal Ab15421. La prueba se realizó en HITACHI 917. Las muestras se cuantificaron a partir de la curva de calibración generada. Como se muestra en la Tabla 2, la composición del anticuerpo policlonal Ab15421 no reaccionó de forma cruzada con fluconazol, itraconazol y voriconazol, lo que indica que se produjo una composición de anticuerpos altamente específica.

Tabla 2. Reactividad cruzada con triazoles antifúngicos

% de reactividad cruzada = 100 X (valor medio de prueba – valor medio del control) ÷ (Conc. del compuesto probado)	
Muestra	Reactividad cruzada (%)
Posaconazol (10 mg/mL)	< 0,01
Posaconazol (10 mg/mL) + Itraconazol (20 µg/mL)	
Posaconazol (10 mg/mL)	< 0,01
Posaconazol(10 mg/mL) + Fluconazol (20 µg /mL)	
Posaconazol (10 mg/mL)	< 0,01
Posaconazol (10 mg/mL) + Voriconazol (20 µg /mL	

Ejemplo 10. Curva de calibración

Se disolvió posaconazol en metanol para producir una solución madre de 1000 µg/mL. El suero humano agrupado se dividió en alícuotas en porciones de 10 mL. Se añadió una solución madre de posaconazol a las alícuotas de suero humano en la preparación de una serie de concentraciones conocidas de calibradores de posaconazol que varían de 0 a 16 µg/mL. El ensayo se realizó usando el reactivo de conjugado enzimático POS-IV G6PDH y el reactivo de anticuerpo que contiene el anticuerpo monoclonal # 7. Las curvas de calibración se generaron en el analizador químico clínico automatizado HITACHI 917, como se describe en el Ejemplo 7 midiendo cada nivel por duplicado. Un ejemplo de estas velocidades de calibrador se muestra en la Tabla 3 y el gráfico se muestra en la Fig. 8.

Tabla 3. Velocidades de curva de calibración

Concentración de posaconazol (mg/mL)	Promedio de velocidad de reacción (mA/min) de duplicados
0,00	466,0
1,0	487,2
2,0	504,3
4,0	521,4
8,0	542,1
16,0	548,8

Como se muestra en la Tabla anterior, la diferencia en la velocidad de reacción para los anticuerpos policlonales a una concentración de posaconazol de 0 µg/mL en comparación con la velocidad de reacción a 16 µg/mL fue de 82,8 mA/min, que fue menor que la diferencia observada para la composición de anticuerpos policlonales descrita anteriormente en el Ejemplo 8.

Ejemplo 11. Especificidad del inmunoensayo en presencia de otros antifúngicos azólicos.

Al suero humano negativo para azoles antifúngicos se añadió posaconazol disuelto en metanol para alcanzar una concentración de 5,0 µg/mL de posaconazol. A una segunda muestra se añadió fluconazol disuelto en metanol para lograr una concentración de 50 µg/mL de fluconazol. De manera similar, itraconazol y voriconazol disueltos en metanol se agregaron a una tercera y cuarta muestra, respectivamente, para lograr una concentración de 50 µg/mL en cada muestra.

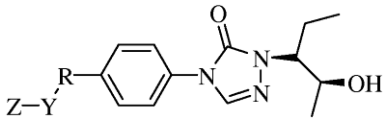
El ensayo se calibró como se describe en el Ejemplo 10 usando el reactivo conjugado enzimático que contiene el conjugado POS-IV G6PDH y el reactivo de anticuerpo que contiene el anticuerpo monoclonal # 7. La prueba se realizó en el HITACHI 917. Las muestras se cuantificaron a partir de la curva de calibración generada. Como se muestra en la Tabla 4, el anticuerpo monoclonal # 7 no reaccionó en forma cruzada de manera significativa con fluconazol, itraconazol y voriconazol, lo que indica que se produjo un anticuerpo altamente específico.

Tabla 4. Anticuerpo monoclonal de posaconazol # 7 con reactividad cruzada del conjugado POS-IV G6PDH

% de reactividad cruzada = 100 X (valor medio de prueba – valor medio del control) ÷ (Conc. del compuesto probado)		
Muestra	Concentración media N = 4 (µg/mL)	Reactividad cruzada (%)
Control de Posaconazol (1,0 µg/mL)	0,86	-
Posaconazol (1,0 µg/mL) + Fluconazol (20 µg/mL)	0,94	0,39
Posaconazol (1,0 µg/mL) + Itraconazol (20 µg/mL)	0,97	0,55
Posaconazol (1,0 µg/mL) + Voriconazol (20 µg/mL)	1,13	1,37

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 1:



en el que

R es CH_2, NH, NHCO, S u O;
Y es un grupo de enlace seleccionado del grupo que consiste en-$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$- -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-NHC(O)-, -C(O)$(CH_2)_n$-NHC(O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$SCH_2C(O)-,-$(CH_2)_n$-C(O)NH-$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-,-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-$(CH_2)_n$-, -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)O-, y -C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)NH-, en donde n es un número entero de 1 a 10; y

Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -OH, -SH, -S-acilo, -O-(alquilo C_{1-8}), halógeno, -NH_2, epoxi, maleimidilo, haloacetamida, carboxilo, carboxilo activado, un transportador inmunogénico, y un marcador, y
sales de los mismos.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el grupo de enlace comprende 1-15 átomos de carbono y/o 0-6 heteroátomos.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el transportador inmunogénico es una proteína seleccionada del grupo que consiste en hemocianinas, globulinas y albúminas, preferiblemente en el que la proteína es albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH).

4. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el transportador inmunogénico es un polisacárido.

5. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el marcador es una enzima seleccionada del grupo que consiste en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa y peroxidasa de rábano picante.

6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que la enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

7. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el grupo carboxilo activado comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en hidroxisuccinimidilo, succinimidilo, carbonato, anhídrido e imidato.

8. Un método para detectar posaconazol, comprendiendo dicho método:

combinar en una mezcla de reacción una muestra que se sospecha que contiene posaconazol con un anticuerpo que se une a posaconazol o un conjugado marcador que comprende un compuesto de fórmula 1 de la reivindicación 1, en el que Z es dicho marcador; y
detectar la presencia o ausencia de un complejo que comprende dicho posaconazol y dicho anticuerpo, en el que la detección comprende determinar la presencia de un producto de reacción enzimático del conjugado marcador,
en el que la presencia del complejo indica la presencia de posaconazol en dicha muestra.

9. El método de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es una composición de anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

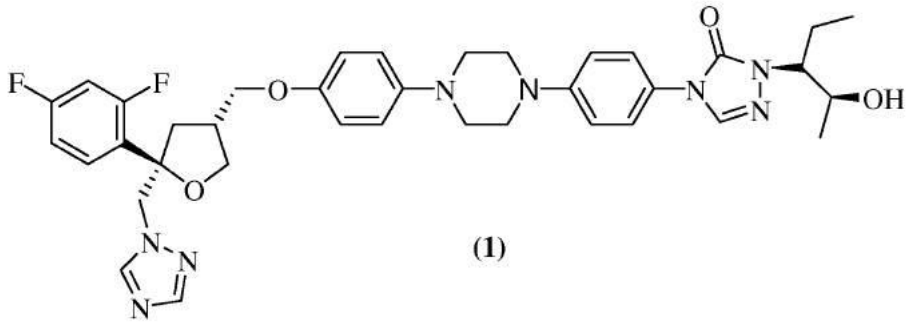
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que el anticuerpo tiene una reactividad cruzada con fluconazol, itraconazol y voriconazol de 1,5% o menos cada uno con respecto a la unión a posaconazol.

11. Un anticuerpo aislado que se une a un epítopo presente en posaconazol y está presente en un compuesto de fórmula 1 de la reivindicación 1.

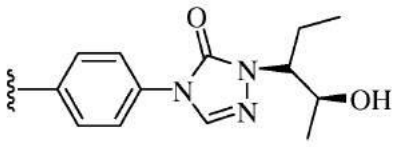
12. Un kit para detectar posaconazol en una muestra, comprendiendo dicho kit:

un anticuerpo aislado de la reivindicación 11; y
instrucciones para un ensayo para detectar posaconazol.

13. El kit de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente un conjugado marcador de fórmula 1.



(1)



(2)

FIG. 1

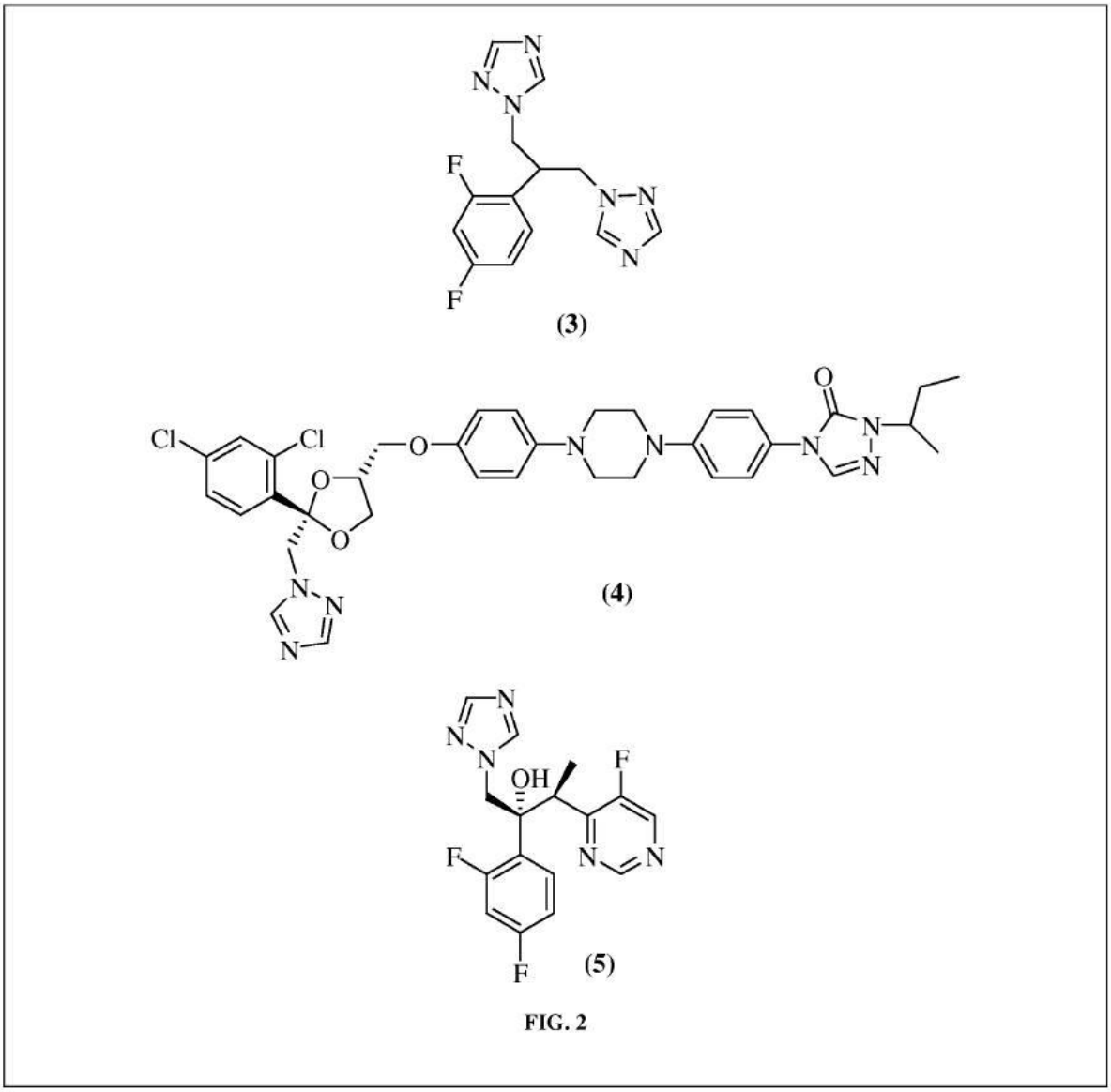


FIG. 2

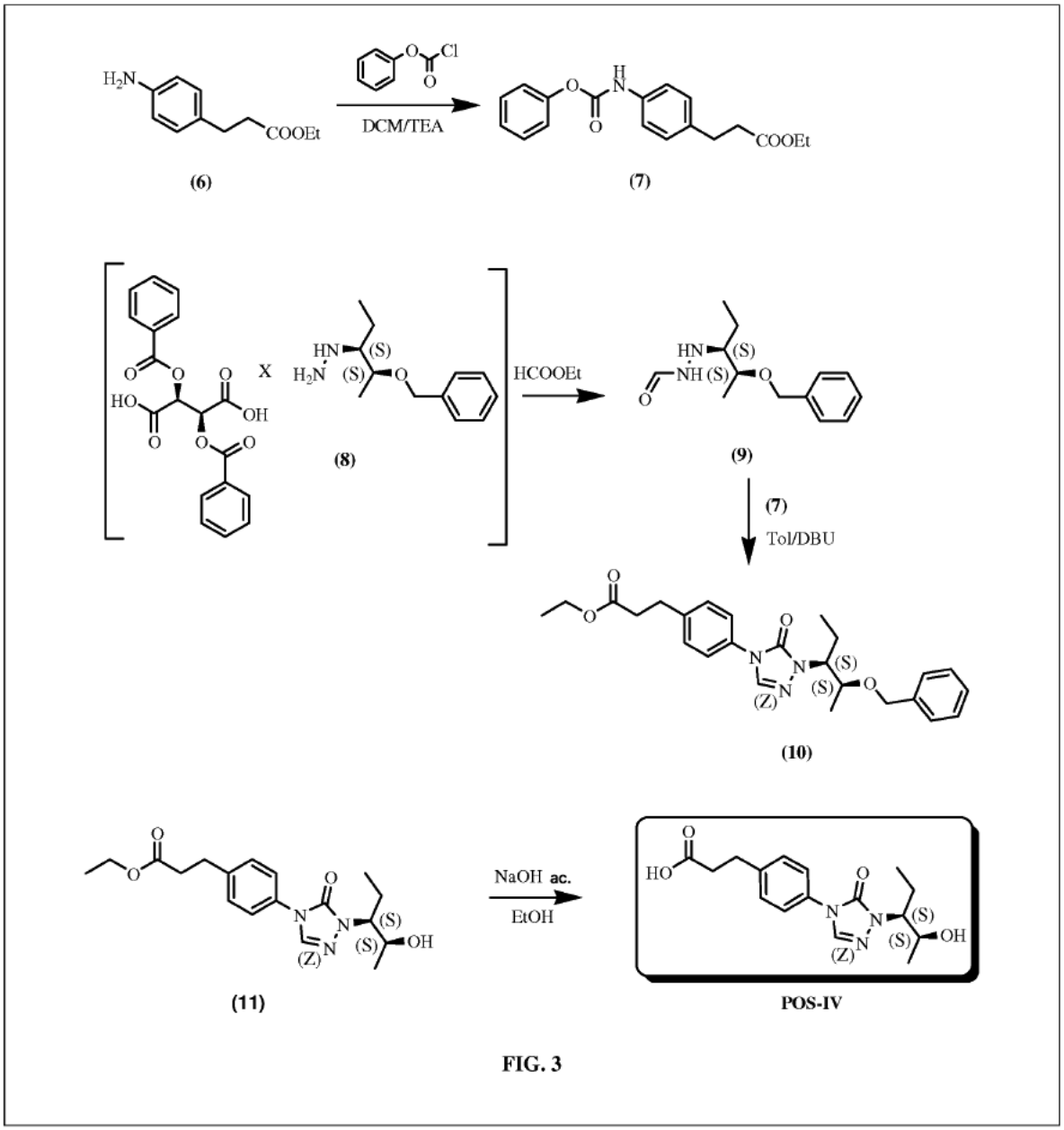


FIG. 3

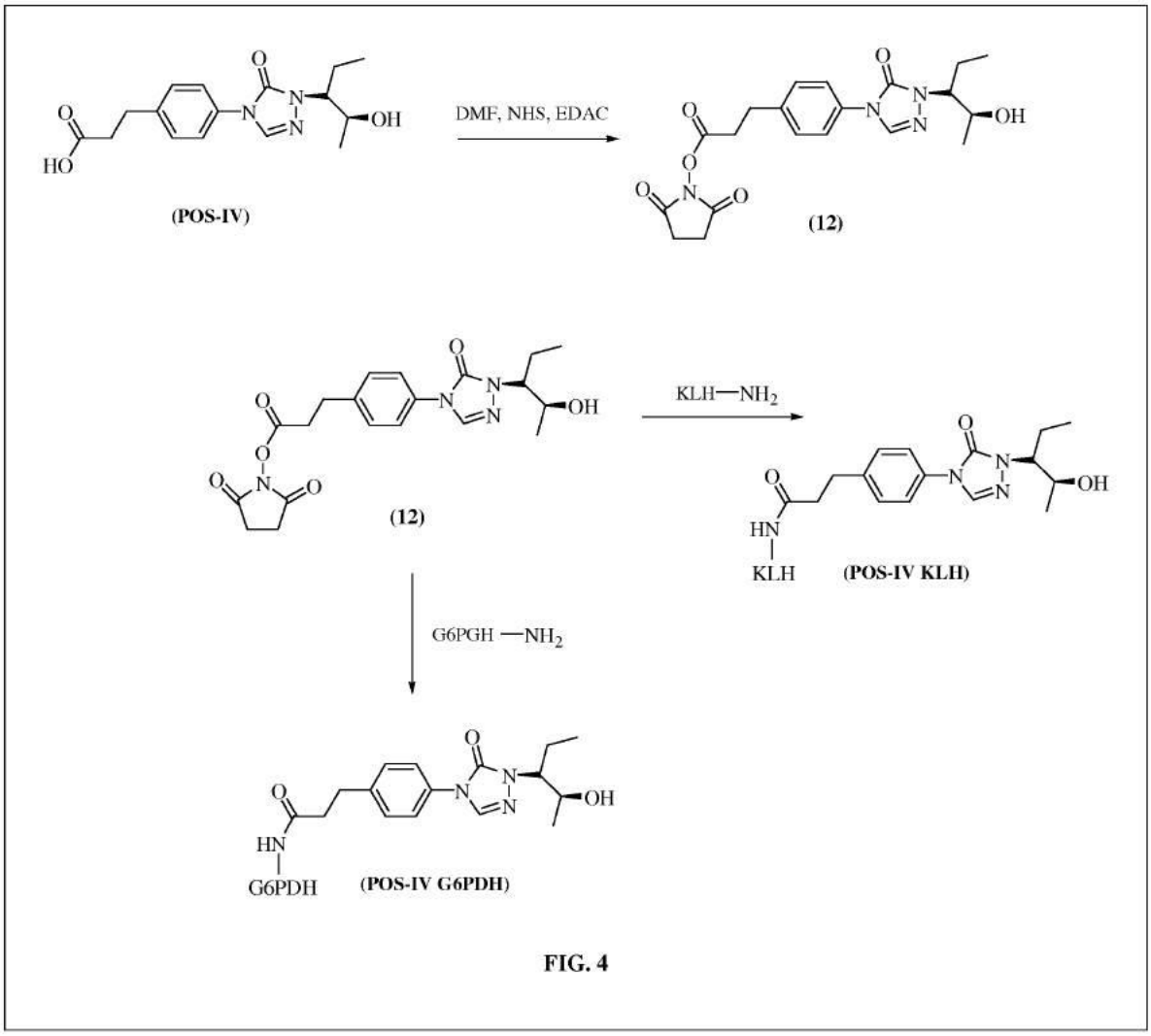


FIG. 4

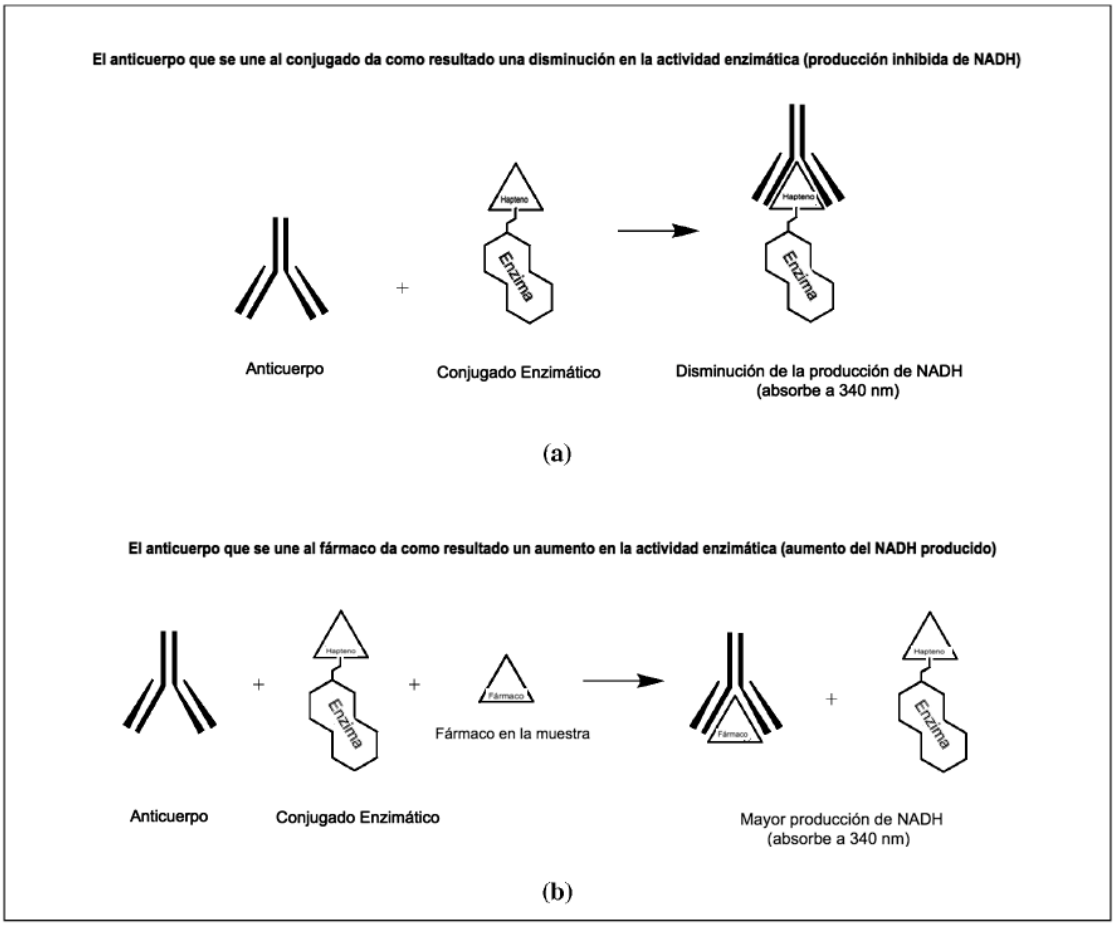

El anticuerpo que se une al conjugado da como resultado una disminución en la actividad enzimática (producción inhibida de NADH)
Hapteno
Enzima
Anticuerpo
Conjugado Enzimático
Disminución de la producción de NADH
(absorbe a 340 nm)
(a)
El anticuerpo que se une al fármaco da como resultado un aumento en la actividad enzimática (aumento del NADH producido)
Fármaco
Fármaco en la muestra
Anticuerpo
Conjugado Enzimático
Mayor producción de NADH
(absorbe a 340 nm)
(b)

FIG. 5

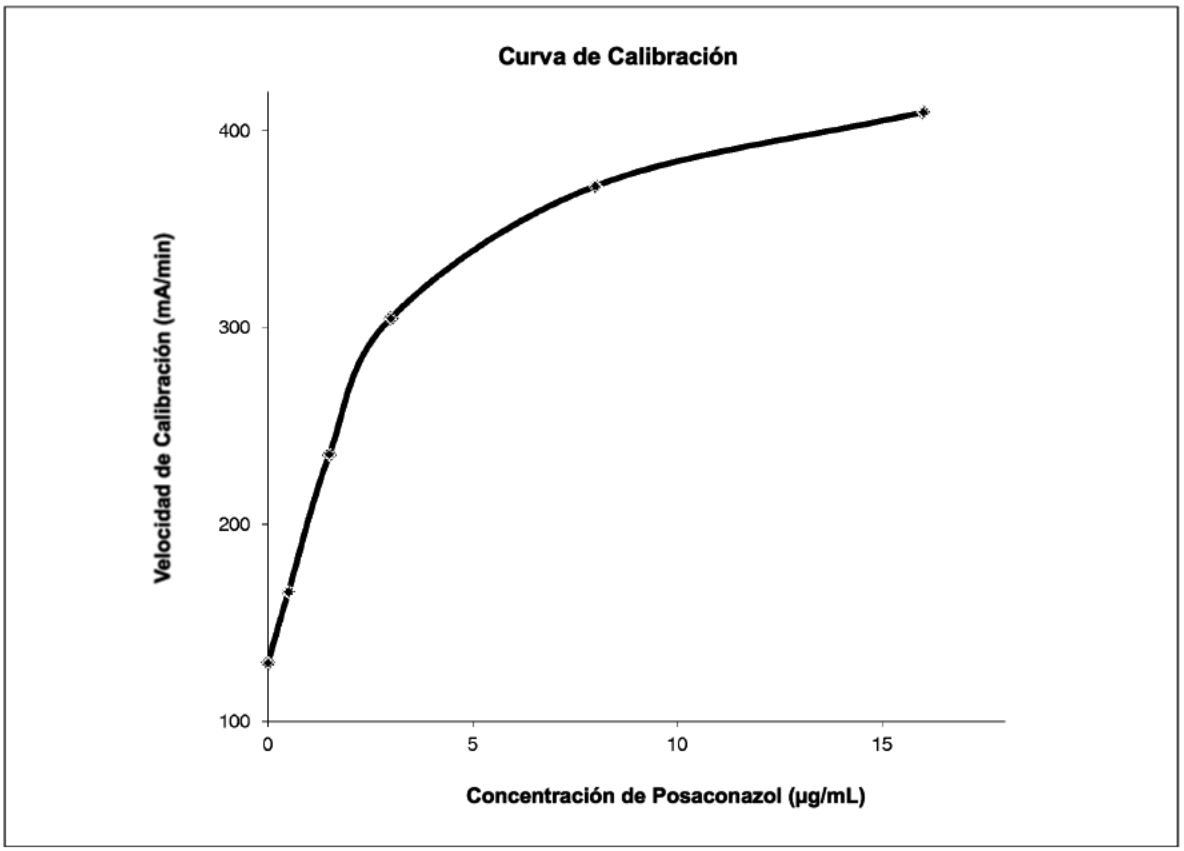

Curva de Calibración
Velocidad de Calibración (mA/min)
400
300
200
100
0
5
10
15
Concentración de Posaconazol (µg/mL)

FIG. 6

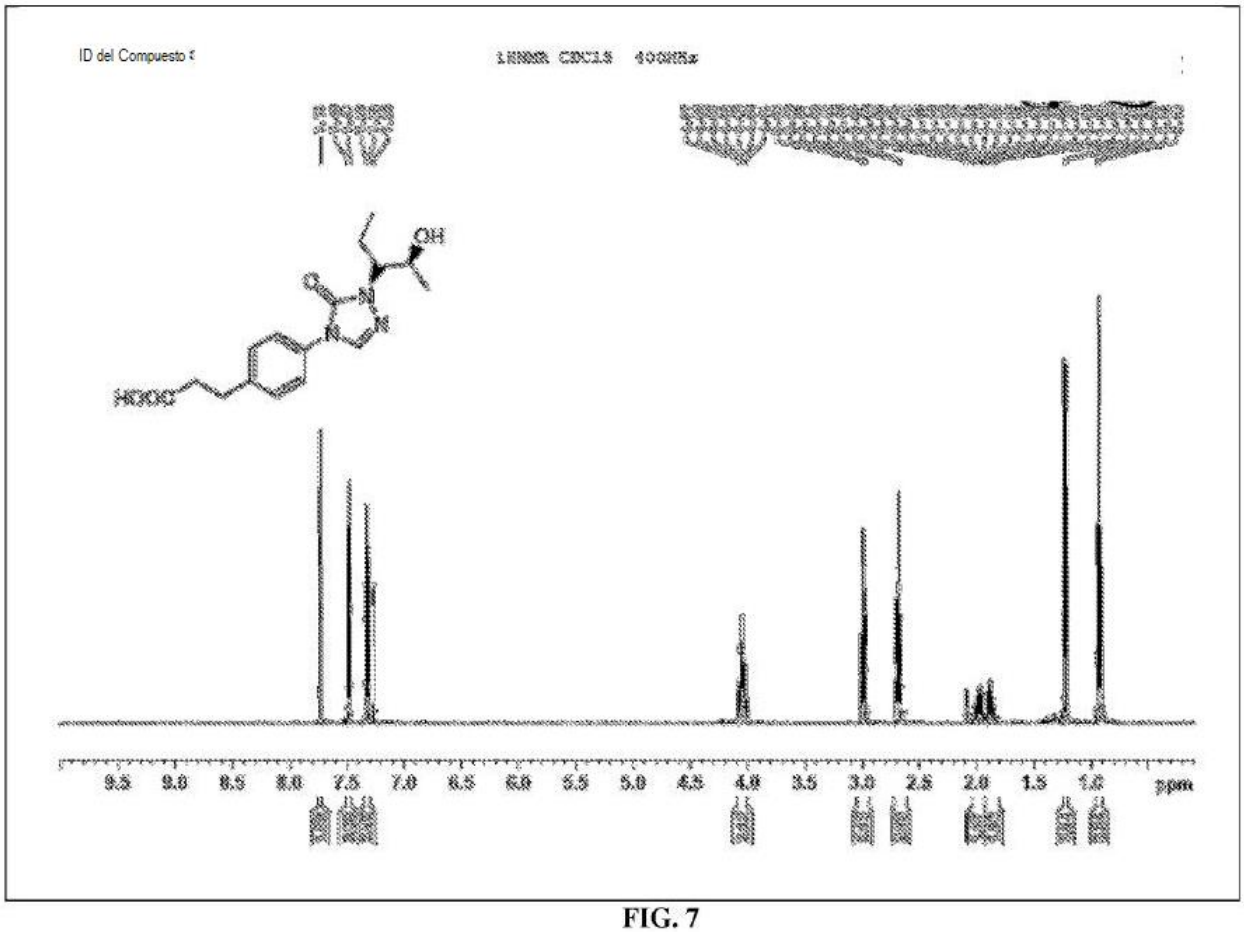

ID del Compuesto
OH
HOOC
9.5
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm

FIG. 7

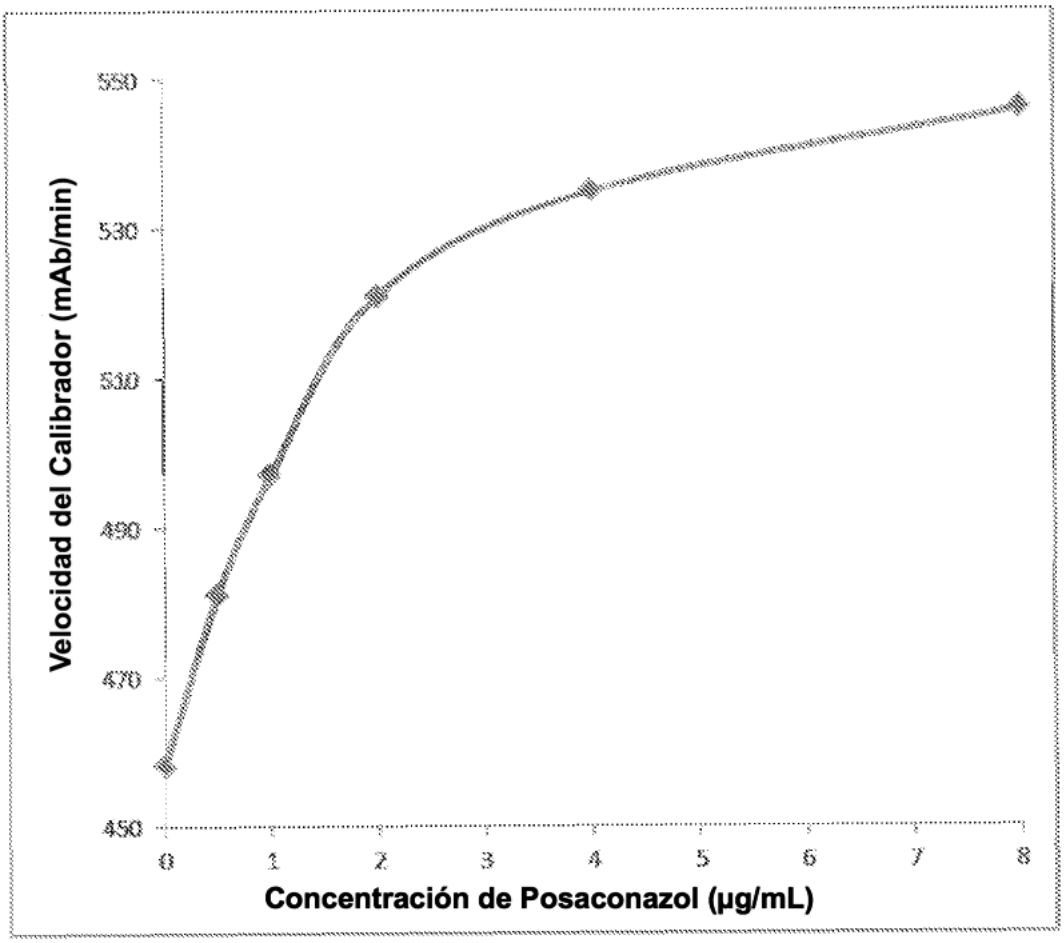

Velocidad del Calibrador (mAb/min)
550
530
510
490
470
450
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Concentración de Posaconazol (µg/mL)

FIG. 8