

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 062**

51 Int. Cl.:

**C07D 495/04** (2006.01)

**A61K 31/554** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013 PCT/US2013/055700**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 13753774 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2888269**

54 Título: **Haptenos de olanzapina**

30 Prioridad:

**21.08.2012 US 201261691454 P**

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

**20.02.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 701 062 T3

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

**DESCRIPCION**

Haptenos de olanzapina

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere al campo de los inmunoensayos para determinar la presencia de olanzapina en fluidos biológicos humanos.

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La WO 2004/014895 y la WO 03/082877 se refieren a aril benzodiazepinas sustituidas con piperazina para uso como antagonistas del receptor de dopamina para el tratamiento de trastornos psicóticos y bipolares.

La EP 0 582 368 se refiere a derivados de tienobenzodiazepina para el tratamiento de trastornos del SNC. La US 2006/046967 se refiere a profármacos que contienen nuevos conectores bio-escindibles.

La WO 2013/088255 Se refiere a profármacos de compuestos de aminas secundarias.

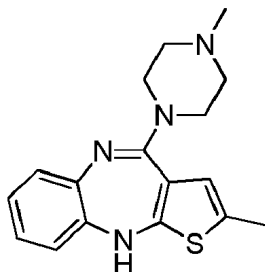
La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico crónico y debilitante que afecta aproximadamente al 0,45-1% de la población mundial (van Os, J.; Kapur, S. "Schizophrenia" Lancet 2009, 374, 635-645). Los principales objetivos del tratamiento son lograr una remisión sostenida de los síntomas psicóticos, reducir el riesgo y las consecuencias de la recaída, y mejorar el funcionamiento del paciente y la calidad de vida en general. Aunque muchos pacientes con esquizofrenia pueden lograr la estabilidad de los síntomas con las medicaciones antipsicóticas disponibles, la falta de cumplimiento con la medicación es una razón común de recaída con las medicaciones orales administradas diariamente. Varios estudios (Abdel-Baki, A.; Ouellet-Plamondon, C.; Malla, A. "Pharmacotherapy Challenges in Patients with First-Episode Psychosis" Journal of Affective Disorders 2012, 138, S3-S14) que investigan los resultados del incumplimiento han demostrado que los pacientes con esquizofrenia que no toman su medicación como se ha prescrito tienen mayores tasas de recaída, ingreso hospitalario y suicidio, así como mortalidad aumentada. Se estima que entre el 40 y el 75% de los pacientes con esquizofrenia tienen dificultades para cumplir con un régimen de tratamiento oral diario (Lieberman, J. A.; Stroup, T. S.; McEvoy, J. P.; Swartz, M. S.; Rosenheck, R. A.; Perkins, D. O.; Keefe, R. S. E.; Davis, S. M.; Davis, C. E.; Lebowitz, B. D.; Severe, J.; Hsiao, J. K. "Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia" New England Journal of Medicine 2005, 353(12), 1209-1223). La monitorización terapéutica de fármacos (TDM) es la cuantificación de las concentraciones en suero o en plasma de fármacos, incluyendo los fármacos antipsicóticos, para la monitorización y optimización del tratamiento. Dicha monitorización permite, por ejemplo, la identificación de pacientes que no cumplen con su régimen de medicación, que no están logrando dosis terapéuticas, que no responden a dosis terapéuticas, que tienen una tolerancia subóptima, que tienen interacciones fármaco-fármaco farmacocinéticas, o que tienen un metabolismo anormal que da como resultado concentraciones en plasma inapropiadas. Existe una considerable variabilidad individual en la capacidad del paciente para absorber, distribuir, metabolizar y excretar fármacos antipsicóticos. Dichas diferencias pueden estar provocadas por enfermedad concurrente, edad, medicación concomitante o peculiaridades genéticas. Diferentes formulaciones de fármacos también pueden influir en el metabolismo de los fármacos antipsicóticos. La TDM permite la optimización de la dosis para pacientes individuales, mejorando los resultados terapéuticos y funcionales. La TDM permite además que un médico que prescribe se asegure del cumplimiento con las dosis prescritas y el logro de concentraciones en suero eficaces.

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

Existe una necesidad de otros métodos para determinar los niveles de fármacos antipsicóticos,

particularmente métodos que se puedan realizar en el consultorio de un practicante clínico que prescribe (donde el tratamiento para un paciente individual puede ajustarse de manera mucho más oportuna) y en otros entornos médicos que carecen de equipos LC o GC/MS o que requieren resultados de pruebas rápidos.

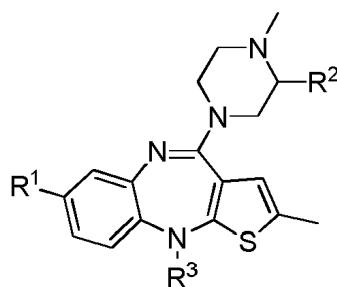
La olanzapina es:



**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención proporciona compuestos y conjugados que permiten tal método mejorado para determinar los niveles del fármaco antipsicótico olanzapina.

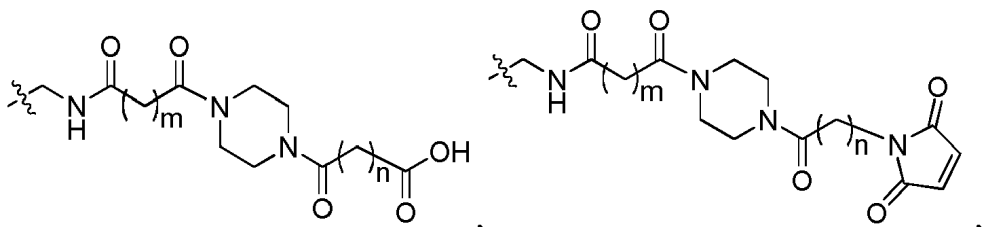
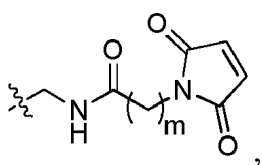
La invención comprende compuestos de Fórmula I



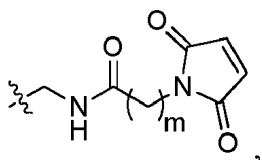
Formula I

en donde:

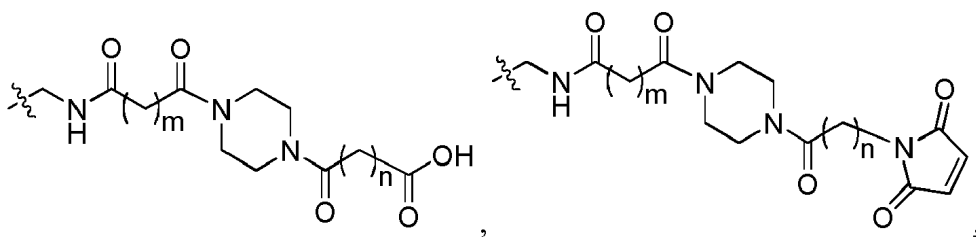
R<sup>1</sup> es H,



CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>2</sup> es H,



5



10

$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 $\text{R}^3$  es H; con la condición de que dos de  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  deben ser H, y además con la condición de que  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  pueden no ser todos H simultáneamente;  
 $m$  es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5.

15

La invención comprende conjugados de compuestos de la invención con portadores inmunogénicos como proteínas, y procesos para producir tales conjugados, dichos procesos comprendiendo poner en contacto los compuestos de la invención con portadores inmunogénicos.

20

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

Las Figs. 1-3 muestre los resultados de ELISA Competitivo generados con tres hibridomas de fusión 11.1 de ratón diferentes;  
 La Fig. 4 muestra el formato de inmunoensayo competitivo usado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral;  
 La Fig. 5 muestra una curva de respuesta a la dosis típica generada con el clon de anticuerpo de olanzapina 35;  
 La Fig. 6 muestra una curva de respuesta a la dosis típica generada con el clon de anticuerpo de olanzapina 61; y  
 La Fig. 7 muestra una curva de respuesta a la dosis típica generada con el anticuerpo de olanzapina 3F11.

30

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35

La presente invención proporciona compuestos y conjugados que permiten la determinación de los niveles de fármacos antipsicóticos. Tales métodos permitirán a los practicantes clínicos evaluar objetivamente en una cita como de probable es que el empeoramiento de los síntomas de un paciente se puedan deber a la falta de cumplimiento. Alternativamente, si lo está cumpliendo, un practicante clínico puede considerar una opción de tratamiento diferente. La monitorización de fármacos terapéuticos, que se permite por tales métodos, es clave para identificar las opciones de tratamiento más eficaces. Además, los practicantes clínicos creen que esta TDM les ayudará a tener una relación muy diferente con sus pacientes, es decir, pasar de una discusión hipotética sobre la falta de cumplimiento del tratamiento a una más colaborativa involucrando a los pacientes para que se responsabilicen activamente en la optimización de su régimen de tratamiento.

40

45

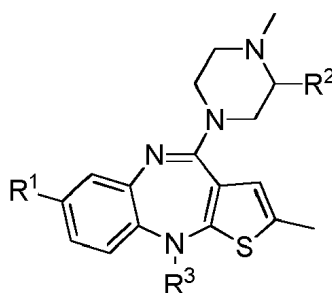
El desarrollo del método requiere primero la síntesis de varios inmunógenos, que comprenden un hapteno sintético enlazado a una proteína. Un hapteno es una molécula pequeña que puede provocar una respuesta inmune cuando se une a un portador grande como una proteína. Son sustancias libres de proteínas, en su mayoría de bajo peso molecular, que no son capaces de estimular la formación de anticuerpos por sí solos, pero que reaccionan con los anticuerpos. Un conjugado hapteno-proteína es capaz de estimular la producción de anticuerpos. La generación de anticuerpos específicos contra moléculas pequeñas es útil para el desarrollo del inmunoensayo (Pharm Res. 1992, 9(11):1375-9, Annali Dell'Istituto Superiore di Sanita. 1991, 27(1):167-74, Annali Dell'Istituto Superiore di Sanita. 1991, 27(1):149-54, Immunology Letters. 1991, 28(1):79-83).

50

La invención comprende compuestos de Fórmula I

55

60



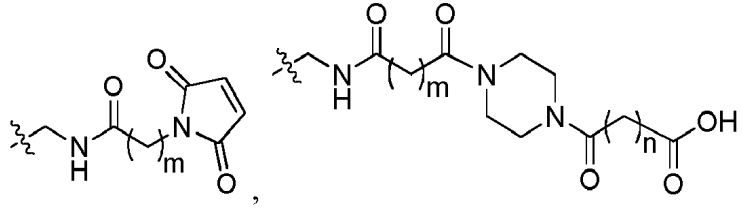
65

Fórmula I en la que:

R<sup>1</sup> es H,

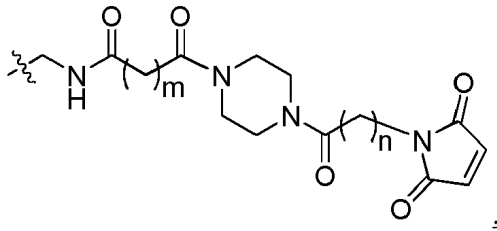
5

10



15

20



25

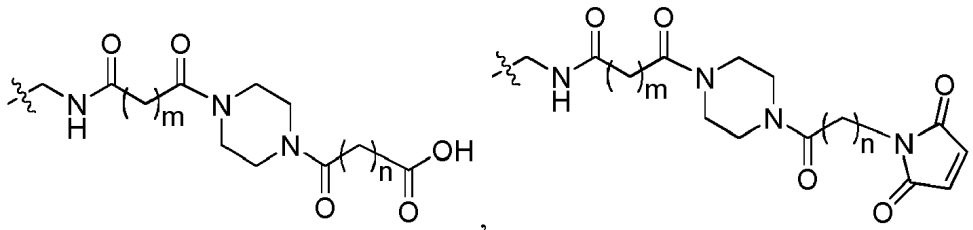
CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>2</sup> es H,

30



35

40



45

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>3</sup> es H; con la condición de que dos de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> deben ser H, y además con la condición de que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> pueden no ser todos H simultáneamente;  
m es 1, 2, 3, 4 o 5;  
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

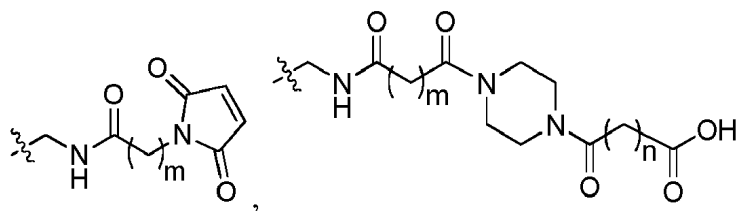
50

Otra realización de la invención comprende compuestos de Fórmula I:  
en los que

R<sup>1</sup> es H,

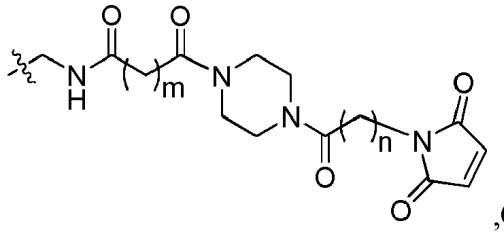
55

60



65

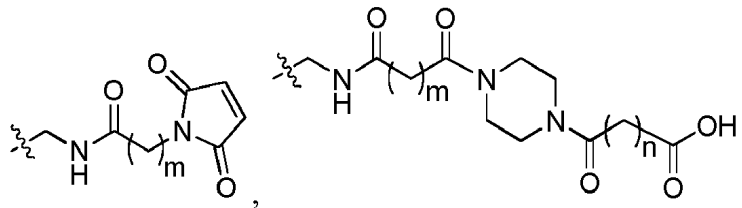
5



10

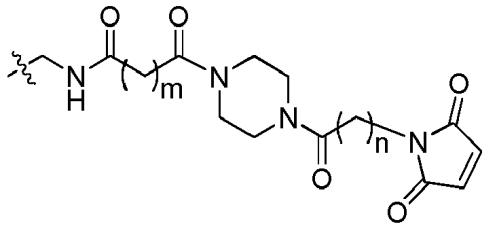
$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 $\text{R}^2$  es H,

15



20

25



30

35

$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 con la condición de que o  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  debe ser H, y además con la condición de que tanto  $\text{R}^1$  como  $\text{R}^2$  pueden no ser H simultáneamente;  
 $\text{R}^3$  es H;  
 $m$  es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5.

40

En la presente también se describen compuestos de Fórmula I:  
 en los que

45

$\text{R}^1$  es H o  $\text{CH}_2\text{NH-(Y)}_p\text{-G}$ ;  
 $\text{R}^2$  es H, o  $\text{CH}_2\text{NH-(Y)}_p\text{-G}$ ; con la condición de que  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  debe ser H, y además con la condición de que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  pueden no ser H simultáneamente;  
 $\text{R}^3$  es H,

50

en donde:

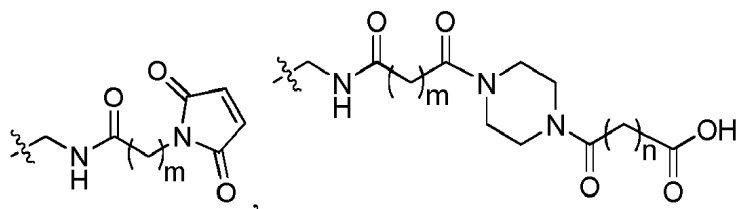
Y es un grupo espaciador orgánico;  
 G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un portador;  
 $p$  es 1.

55

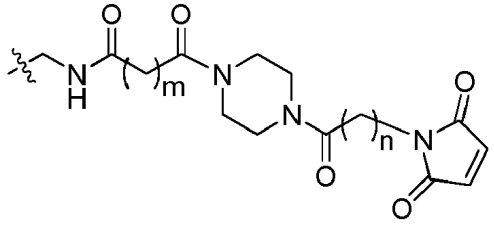
Otra realización de la invención comprende compuestos de Fórmula 1: en los que:

65

$\text{R}^1$  es H,



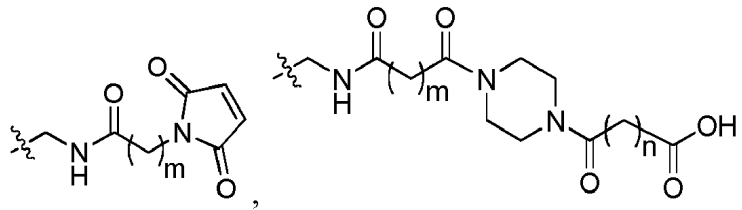
5



10

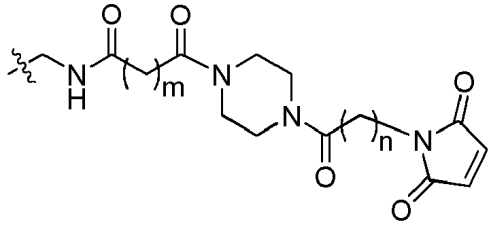
$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 $\text{R}^2$  es H,

15



20

25



30

$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ; con la condición de que o  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  debe ser H, y además con la condición de que tanto  $\text{R}^1$  como  $\text{R}^2$  pueden no ser H simultáneamente;  
 $\text{R}^3$  es H;  
 $m$  es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5.

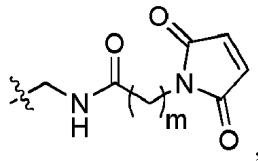
35

En otra realización de la invención:

40

$\text{R}^1$  es H,

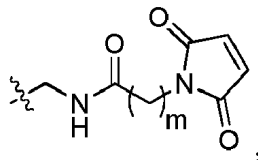
45



50

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

55



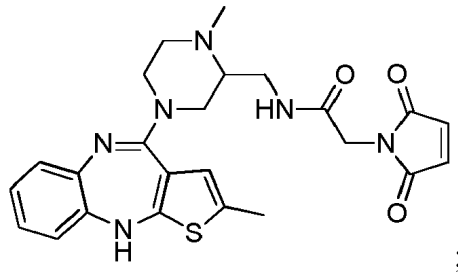
60

$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ; con la condición de que o  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  debe ser H, y además con la condición de que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  pueden no ser H simultáneamente;  
 $\text{R}^3$  es H;  
 $m$  es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5.

65

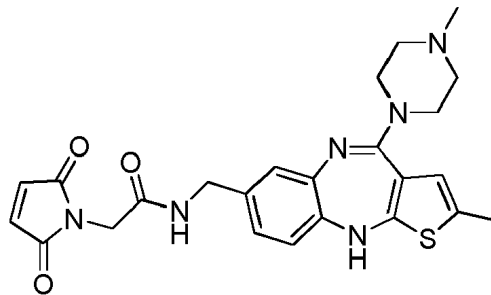
Otra realización de la invención es un compuesto de Fórmula I que es:

5



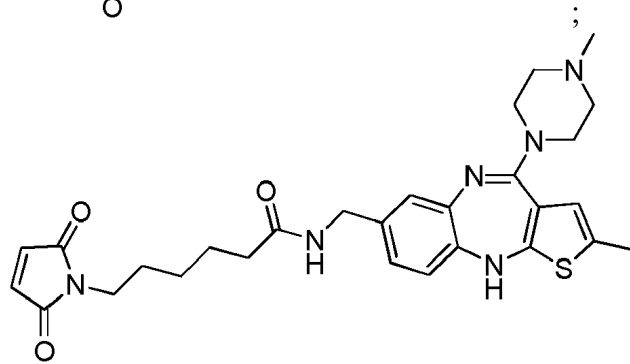
10

15



20

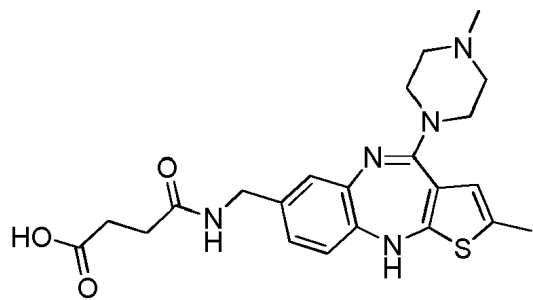
25



30

35

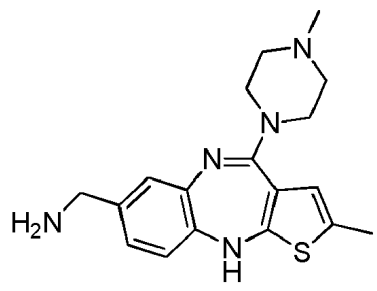
40



45

50

55



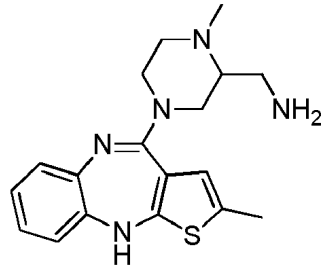
60

65

o



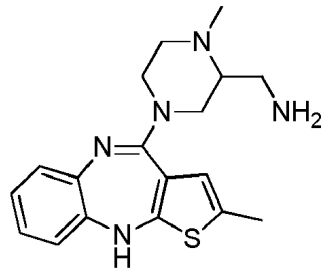
5



10

Una realización preferida de la invención es el compuesto:

15

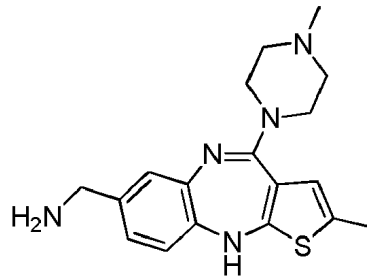


20

25

Una realización preferida de la invención es el compuesto:

30



35

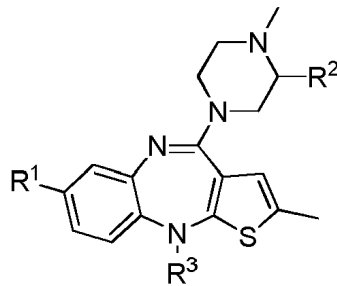
40

La invención proporciona además conjugados de los compuestos de la invención con un portador inmunogénico.

45

Otra realización de la invención es por tanto un conjugado de un compuesto de Fórmula I

50



55

Formula I

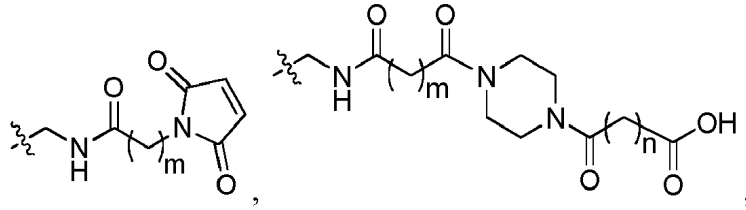
60

en el que:

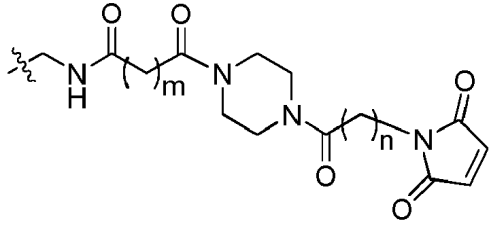
R<sup>1</sup> es H,

65

5



10

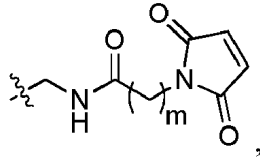


15

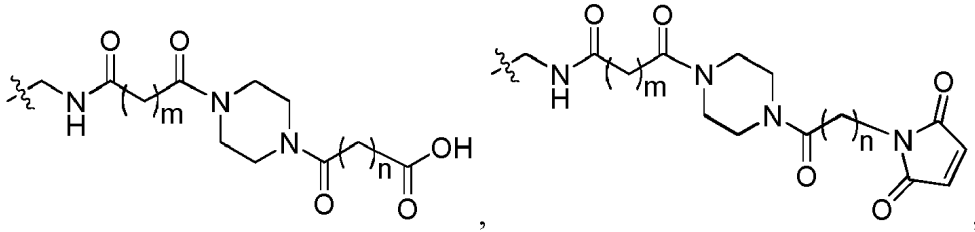
20

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

25



30



35

40

$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 $\text{R}^3$  es H; con la condición de que dos de  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  deben ser H, y además con la condición de que  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  pueden no ser todos H simultáneamente;  
 $m$  es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5; y un portador inmunogénico.

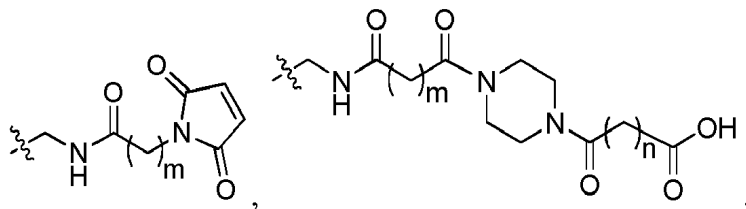
45

Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en el que:

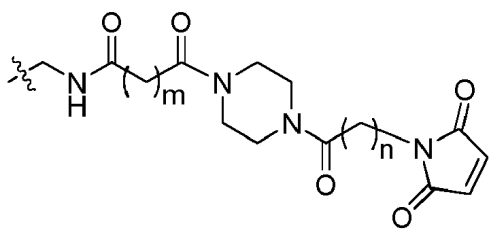
50

$\text{R}^1$  es H,

55



60



65

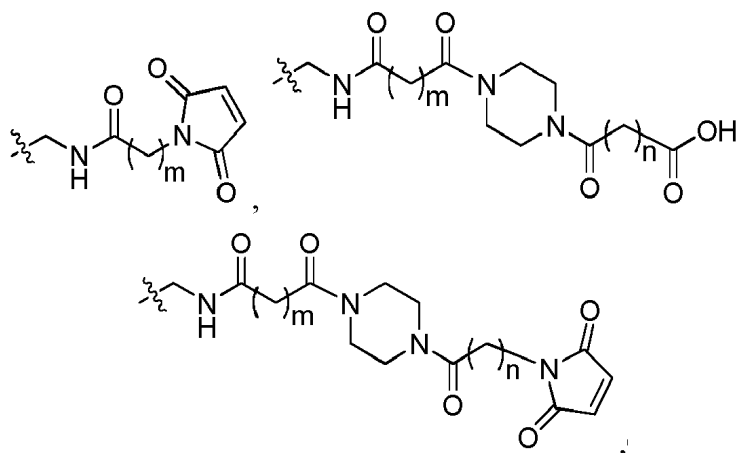
CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>2</sup> es H,

5

10

15

20



CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H; con la condición de que o R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> debe ser H, y además con la condición de que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden no ser H simultáneamente;

R<sup>3</sup> es H;

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

n es 1, 2, 3, 4 o 5; y un portador inmunogénico.

25

También se describe en la presente un conjugado de un compuesto de Fórmula I en el que:

30

R<sup>1</sup> es H o CH<sub>2</sub>NH-(Y)<sub>p</sub>-G;

R<sup>2</sup> es H, o CH<sub>2</sub>NH-(Y)<sub>p</sub>-G; con la condición de que R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> debe ser H, y además con la condición de que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden no ser H simultáneamente;

R<sup>3</sup> es H;

35 en donde:

Y es un grupo espaciador orgánico;

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

p es 1; y un portador inmunogénico.

40

Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en el que:

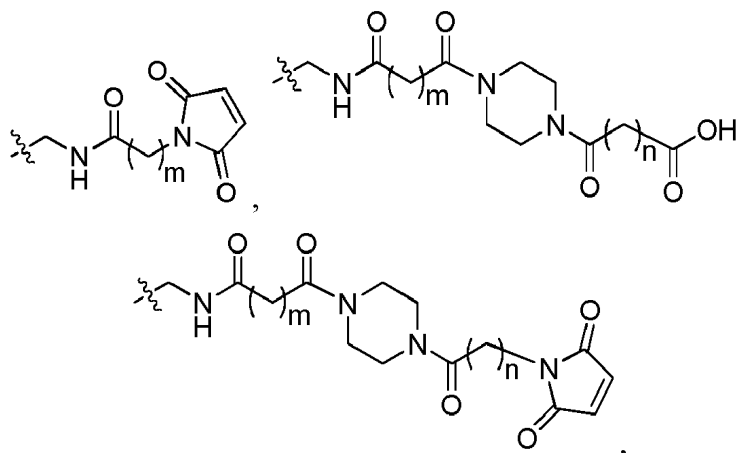
R<sup>1</sup> es H,

45

50

55

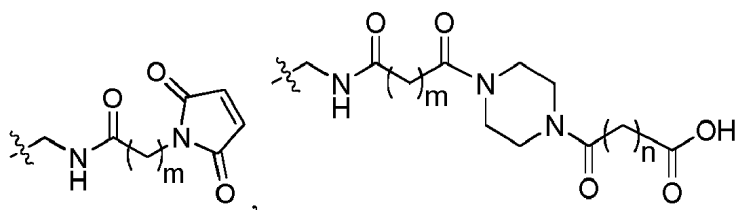
60



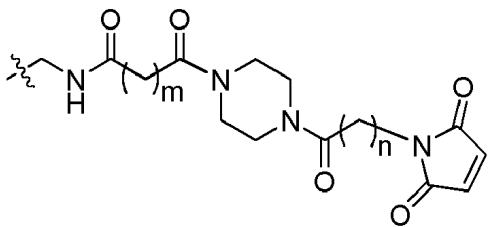
CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>2</sup> es H,

65

5



10



15

20

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H; con la condición de que R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> debe ser H, y además con la condición de que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden no ser H simultáneamente;

R<sup>3</sup> es H;

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

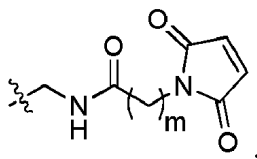
n es 1, 2, 3, 4 o 5; y un portador inmunogénico.

25

Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en el que:

R<sup>1</sup> es H,

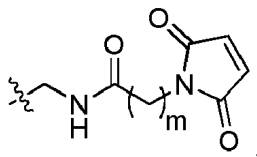
30



35

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>2</sup> es H,

40



45

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H; con la condición de que o R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> deben ser H, y además con la condición de que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden no ser H simultáneamente;

R<sup>3</sup> es H;

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

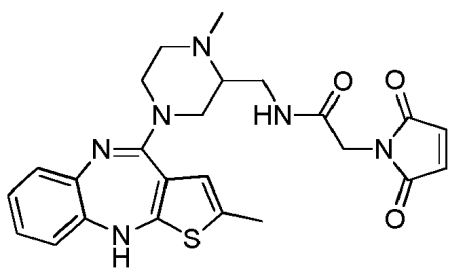
50

n es 1, 2, 3, 4 o 5; y un portador inmunogénico.

Una realización preferida de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de

55

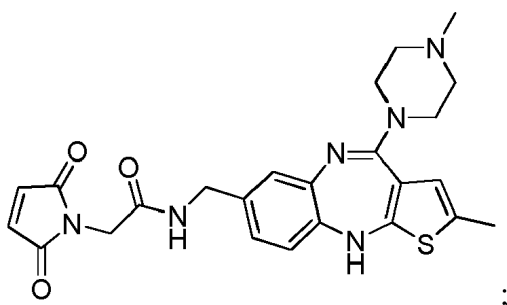
60



65

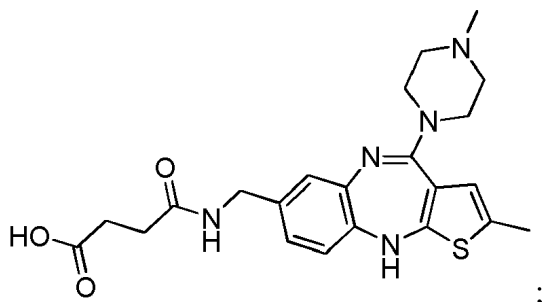
5

10



15

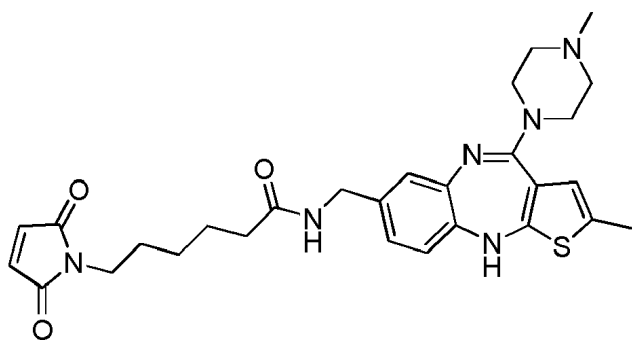
20



25 y

30

35



40

y un portador inmunogénico.

Las realizaciones preferidas de la invención son los conjugados anteriores en los que el portador inmunogénico es una proteína.

45

Las realizaciones más preferidas de la invención son los conjugados anteriores en los que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovoalbúmina.

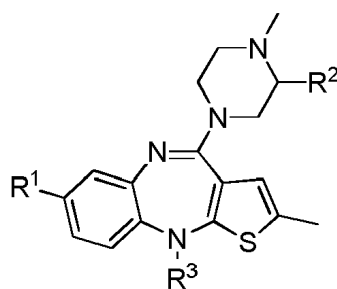
La invención también proporciona productos formados por el proceso de poner en contacto los compuestos anteriores con un portador inmunogénico.

50

Otra realización de la invención es, por tanto, un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto de Fórmula I

55

60



65

Formula I

en el que:

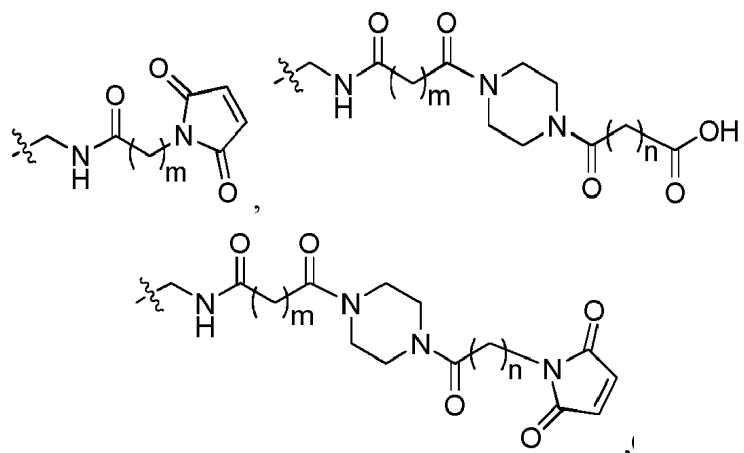
R<sup>1</sup> es H,

5

10

15

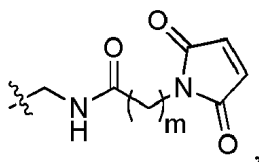
20



CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>2</sup> es H,

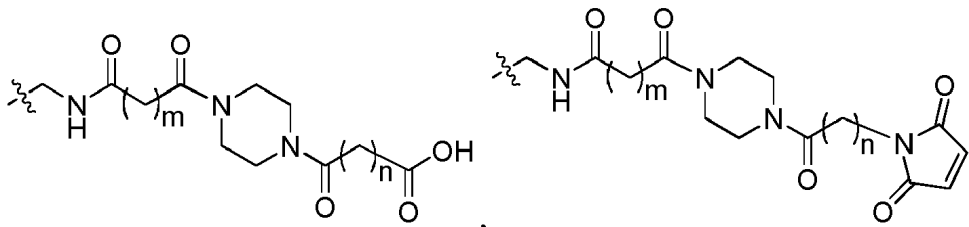
25

30



35

40



CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;

R<sup>3</sup> es H; con la condición de que dos de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> deben ser H, y además con la condición de que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> puede no ser todos H simultáneamente;

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

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

45

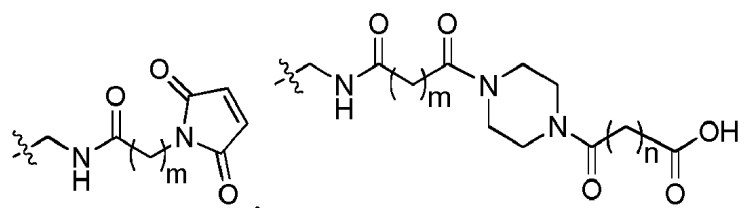
Otra realización de la invención es un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto de Fórmula I en el que:

50

R<sup>1</sup> es H,

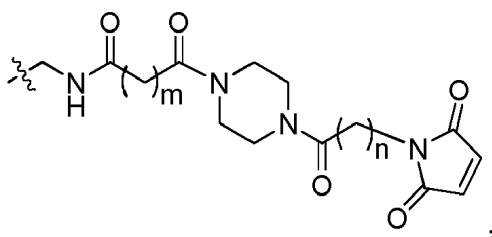
55

60



65

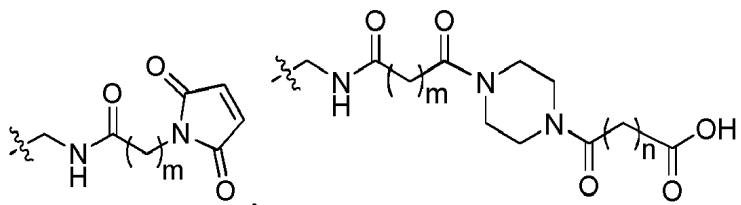
5



10

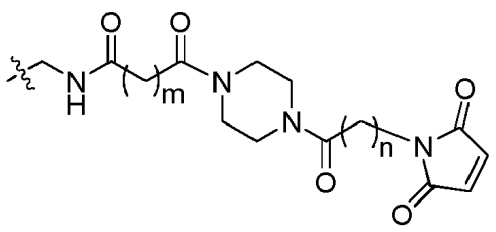
$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 $\text{R}^2$  es H,

15



20

25



30

35

$\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 $\text{R}^3$  es H, con la condición de que o  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  debe ser H, y además con la condición de que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  pueden no ser H simultáneamente;  
 $m$  es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5; con un portador inmunogénico.

40

En la presente también se describe un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto de Fórmula I en el que:

45

$\text{R}^1$  es H o  $\text{CH}_2\text{NH-(Y)}_p\text{-G}$ ;  
 $\text{R}^2$  es H, o  $\text{CH}_2\text{NH-(Y)}_p\text{-G}$ ; con la condición de que o  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  debe ser H, y además con la condición de que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  pueden no ser H simultáneamente;  
 $\text{R}^3$  es H,

en el que:

50

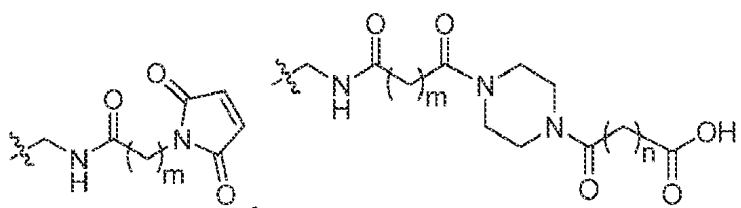
Y es un grupo espaciador orgánico;  
G es un grupo de enlace funcional capaz de unirse a un portador;  
p es 1; con un portador inmunogénico.

55

Otra realización de la invención es un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto de Fórmula I en el que:

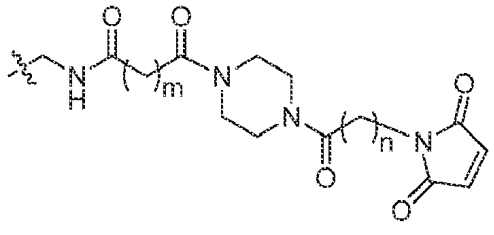
60

$\text{R}^1$  es H,



65

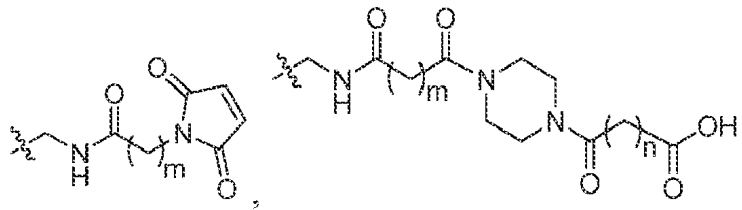
5



10

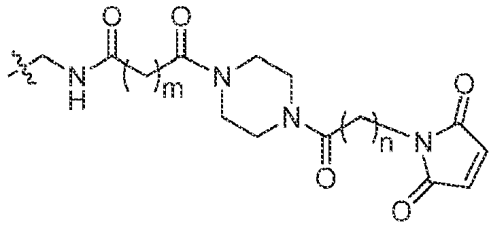
$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 $\text{R}^2$  es H,

15



20

25



30

$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ; con la condición de que o  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  deben ser H, y además con la condición de que  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^2$  pueden no ser H simultáneamente;  
 $\text{R}^3$  es H;  
 $m$  es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5; con un portador inmunogénico.

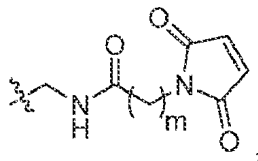
35

Otra realización de la invención es un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto de Fórmula I en el que:

40

$\text{R}^1$  es H,

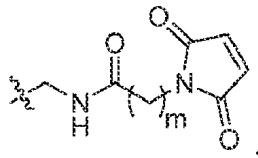
45



50

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

55



60

$\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ; con la condición de que o  $\text{R}^1$  o  $\text{R}^2$  deben ser H, y además con la condición de que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  pueden no ser H simultáneamente;  
 $\text{R}^3$  es H;  
 $m$  es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5; con un portador inmunogénico.

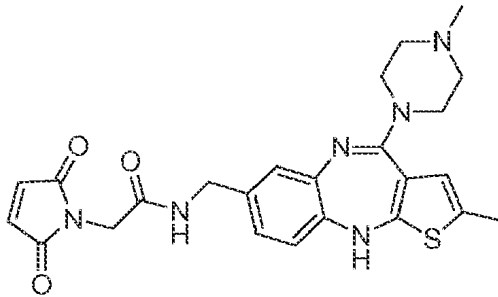
65



Otra realización preferida de la invención es un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto que es

5

10



15

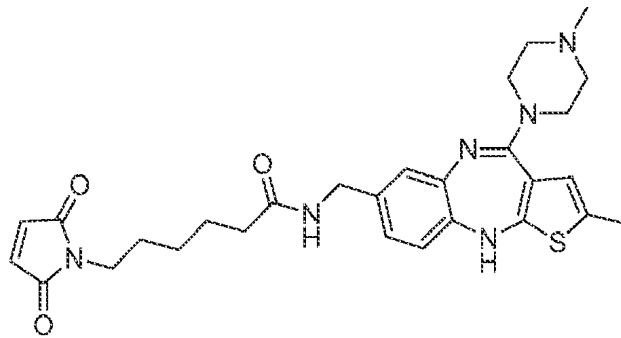
con un portador inmunogénico.

Otra realización preferida de la invención es un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto que es

20

25

30



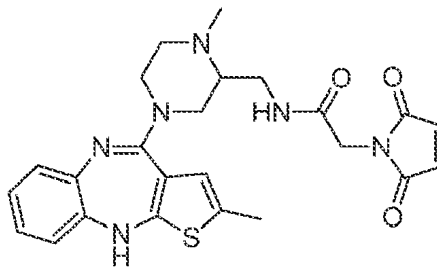
35

con un portador inmunogénico.

Otra realización preferida de la invención es un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto que es

40

45



50

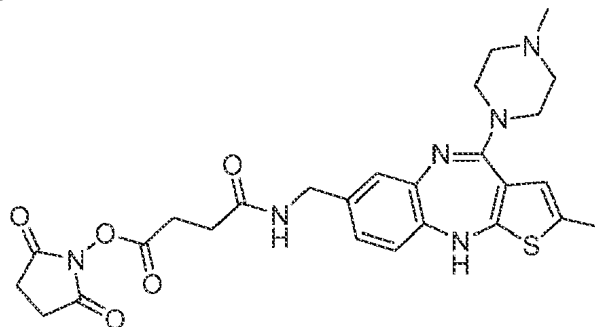
con un portador inmunogénico.

Otra realización preferida de la invención es un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto un compuesto que es

55

60

65



con un portador inmunogénico.

Una realización más preferida de la invención es un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto los compuestos anteriores con un portador inmunogénico en donde el portador inmunogénico es una proteína y en donde la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovalbúmina.

## ABREVIATURAS

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

10	AMAS	Éster de N-( $\alpha$ -maleimidoacetoxi)succinimida
	BTG	tiroglobulina bovina
	Bu <sub>3</sub> N	tributilamina
	DCC	diciclohexilcarbodiimida
15	DCM	diclorometano
	DIEA	diisopropiletilamina
	DMF	N,N-dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	EDTA	ácido etilendiaminotetracético
20	KLH	hemocianina de lapa californiana
	SATA	N-succinimidil S-acetilacetato
	TEA	triethylamina
	THF	tetrahidrofurano
	TFA	ácido trifluoroacético
25	r.t.	temperatura ambiente
	DIC	diisopropilcarbodiimida
	DMAP	N,N-dimetil-4-aminopiridina
	EDC	clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
	NHS	N-hidroxisuccinimida
30	TFP	Tetrafluorofenilo
	PNP	p-nitrofenilo
	TBTU	tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	HOBT	N-hidroxibenzotriazol
	DEPBT	3-(dietoxifosforilo)-1,2,3-benzotrazin-4(3H)-ona
35	BOP-Cl	cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico
	TDT	ditioeritrol

## DEFINICIONES

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

45 El término "hapteno" se refiere a un antígeno parcial o incompleto. Un hapteno es una sustancia libre de proteínas, que no es capaz de estimular la formación de anticuerpos, pero que reacciona con los anticuerpos. Los anticuerpos se forman acoplado un hapteno con un portador inmunogénico de alto peso molecular, y luego inyectando este producto acoplado, es decir, un inmunógeno, en un sujeto humano o animal.

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

55 Un "portador inmunogénico", como se usa en la presente, es una sustancia inmunogénica, comúnmente una proteína, que puede unirse en una o más posiciones con haptenos, permitiendo de este modo la producción de anticuerpos que pueden unirse específicamente con estos haptenos. Los ejemplos de sustancias portadoras inmunogénicas incluyen, pero no están limitadas a, proteínas, glicoproteínas, poliamino-polisacáridos complejos, partículas, y ácidos nucleicos que se reconocen como extraños y por lo tanto provocan una respuesta inmunológica del huésped. Los poliamino-polisacáridos pueden prepararse a partir de polisacáridos usando cualquiera de los medios convencionales conocidos para esta preparación.

60 Pueden emplear varios tipos de proteínas como portadores inmunogénicos, incluyendo sin limitación, albúminas, proteínas séricas, lipoproteínas, etc. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina de suero bovino, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina de huevo, tiroglobulina bovina, albúmina de suero humano fracción V, albúmina de conejo, globulina de semillas de calabaza, toxoide diftérico, toxoide tetánico, toxina botulinus,

proteínas succiniladas y poli(aminoácidos)sintéticos, como polilisina.

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

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

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

El término "derivado" se refiere a un compuesto químico o molécula elaborada a partir de un compuesto original por una o más reacciones químicas.

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

Un "marcador", "molécula detectora" o "informador" es cualquier molécula que produce, o puede inducirse que produzca, una señal detectable. El marcador puede conjugarse con un analito, inmunógeno, anticuerpo, o con otra molécula, como un receptor o una molécula que puede unirse a un receptor como un ligando, particularmente un hapteno. Ejemplos no limitativos de marcadores incluyen isótopos radiactivos (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ), enzimas (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa), fragmentos de enzimas, sustratos enzimáticos, inhibidores de enzimas, coenzimas, catalizadores, fluoróforos (por ejemplo, rodamina, isotiocianato de fluoresceína o FITC, o Dylight 649), colorantes, quimioluminiscentes y luminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, luciferina) o sensibilizantes.

Como se usa en la presente, un "espaciador" se refiere a una porción de una estructura química que conecta dos o más subestructuras como haptenos, portadores, inmunógenos, marcadores o compañeros de unión a través de un grupo de enlace funcional. Estos grupos espaciadores se componen de los átomos típicamente presentes y se ensamblan de maneras típicamente encontradas en compuestos orgánicos y, por lo tanto, pueden ser referidos como "grupos espaciadores orgánicos". Los bloques de construcción químicos usados para ensamblar los espaciadores se describirán en lo sucesivo en esta solicitud. Entre los espaciadores preferidos están las cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas. Estas cadenas de carbono también pueden incluir uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos que reemplazan uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o en los extremos terminales de las cadenas. Por "heteroátomos" se entiende átomos distintos de carbono que se eligen del grupo que consiste de oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, en donde los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación y pueden tener carbono u otros heteroátomos unidos a ellos. El espaciador también puede incluir grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos en la cadena.

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

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

Los grupos espaciadores pueden usarse para enlazar el hapteno al portador. Los espaciadores de diferentes longitudes permiten unir el hapteno con diferentes distancias del portador para su presentación al sistema inmune del animal o humano que se está inmunizando para optimizar el proceso de formación de anticuerpos. La unión a diferentes posiciones en la molécula de hapteno brinda la oportunidad de presentar sitios específicos en el hapteno al sistema inmunitario para influir en el reconocimiento de anticuerpos. El espaciador puede contener

grupos solubilizantes hidrófilos para hacer que el derivado de hapteno sea más soluble en medios acuosos. Los ejemplos de grupos solubilizantes hidrófilos incluyen, pero no están limitados a, grupos polioialquilo, por ejemplo, cadenas de polietilenglicol, grupos hidroxilo, carboxilato y sulfonato.

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

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

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

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

25 El término "heteroátomo" se refiere a un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo de fósforo o un átomo de azufre en el que los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación permitido.

30 El término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo que incluye uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos que reemplazan uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o en los extremos terminales de las cadenas. El término "heterociclilo" se refiere a un anillo no aromático (es decir, saturado o parcialmente insaturado) compuesto de 3 a 7 átomos de carbono y por lo menos un heteroátomo seleccionado de N, O o S. Los sustituyentes alquilo pueden estar presentes opcionalmente en el anillo. Los ejemplos incluyen tetrahidrofurilo, dihidropiraniolo, piperidilo, 2,5-dimetilpiperidilo, morfolinilo, piperazinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, imidazolidinilo e imidazolinilo.

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

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

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

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

50 El término "polialcoxialquilo" se refiere a compuestos alcoxi de cadena larga e incluye polietilenglicoles de tamaños discretos o monodispersos.

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

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

60 El término "carboxialquilo" se refiere a por lo menos un grupo carboxilato unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo. El término "grupo carboxilato" incluye ácidos carboxílicos y ésteres de carboxilato de alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo.

65 El término "heteroarilo" se refiere a radicales de anillos aromáticos bicíclicos de 5 a 7 miembros mono- u 8 a 10 miembros, cualquier anillo de los cuales puede consistir de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O o S donde los átomos de nitrógeno y de azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación permitido. Los ejemplos

incluyen benzimidazolilo, benzotiazolilo, benzotienilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, pirazinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolinilo, tiazolilo y tienilo.

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

10 El término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo C<sub>1-6</sub> que contiene un sustituyente arilo. Los ejemplos incluyen bencilo, feniletilo o 2-naftilmetilo.

El término "acilo" se refiere al grupo -C(O)R<sub>a</sub>, donde R<sub>a</sub> es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, arilo, aralquilo y heteroarilo. Un "agente de acilación" añade el grupo -C(O)R<sub>a</sub> a una molécula.

15 El término "sulfonilo" se refiere al grupo -S(O)<sub>2</sub>R<sub>b</sub>, donde R<sub>b</sub> es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, haloalquilo, arilo, aralquilo y heteroarilo. Un "agente de sulfonilación", añade el grupo -S(O)<sub>2</sub>R<sub>a</sub> a una molécula.

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

30 Para los haptenos que llevan un grupo amino, los modos de unión del espaciador al hapteno incluyen la reacción de la amina en el hapteno con un bloque de construcción de espaciadores que lleva un haluro de acilo o un éster activo. Los "ésteres activos" se definen como ésteres que experimentan una reacción con un grupo nucleófilo, por ejemplo un grupo amino, bajo condiciones suaves para formar un enlace estable. Un enlace estable se define como uno que permanece intacto bajo condiciones de uso adicional, por ejemplo, pasos sintéticos posteriores, uso como inmunógeno o, en un ensayo bioquímico. Un ejemplo preferido de un enlace estable es un enlace amida. Los ésteres activos y los métodos de formación se describen por Benoiton, N.L., en Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*, Thieme Stuttgart, Nueva York, vol. E22 sección 3.2:443 y Benoiton, N.L., *Chemistry of Peptide Synthesis*, Taylor and Francis, NY, 2006. Los ésteres activos preferidos incluyen éster de p-nitrofenilo (PNP), éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y éster de tetrafluorofenilo (TFP). Los haluros de acilo pueden prepararse por muchos métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, reacción del ácido carboxílico con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, ver: Fieser, L.F. y Fieser, M. *Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, NY, 1967 y referencias en el mismo. Estos se pueden convertir en otros ésteres activos, como ésteres de p-nitrofenilo (PNP), que también pueden usarse en espaciadores bifuncionales activos como se describe por Wu et al, *Organic Letters*, 2004, 6(24):4407. Los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) pueden prepararse por reacción de carbonato de N,N-disuccinimidilo (CAS 74124-79-1) con el ácido carboxílico de un compuesto en presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiletilamina en un disolvente aprótico bajo condiciones anhidras como se describe en el ejemplo 35 de la WO2012012595 o usando N-hidroxisuccinimida y dicitclohexilcarbodiimida (DCC) u otro agente deshidratante, bajo condiciones anhidras. Los ésteres de tetrafluorofenilo (TFP) pueden prepararse mediante la reacción de ácidos carboxílicos con 2,3,5,6-tetrafluorofeniltrifluoroacetato en presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiletilamina en un solvente aprótico bajo condiciones anhidras como se informa por Wilbur, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2004,15(1):203. Un experto en la técnica reconocerá que los espaciadores mostrados en la Tabla 1, entre otros, pueden obtenerse usando métodos conocidos y unirse a haptenos portadores de amino utilizando optimización rutinaria de las condiciones de reacción. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un portador.

60

65

Tabla 1

5		
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		Los valores razonables para m y n están entre 1 y 10
45		

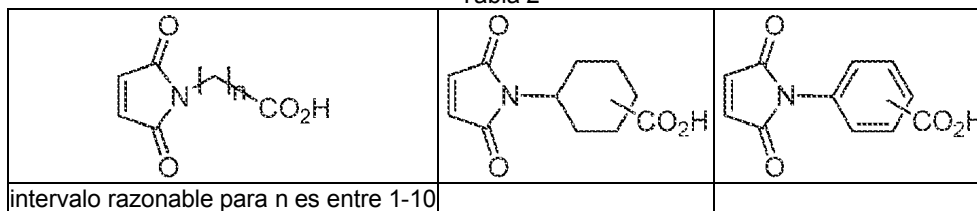
50 También puede usarse el acoplamiento directo de la amina en el hapteno y una funcionalidad de ácido  
 55 carboxílico en el bloque de construcción espaciador en presencia de un agente de acoplamiento como un modo de  
 unión. Los reactivos preferidos son aquellos que se usan típicamente en la síntesis de péptidos. Los reactivos de  
 60 acoplamiento de péptidos incluyen, pero no están limitados a, tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-  
 tetrametiluronio (TBTU, CAS N° 125700-67-6), ver: Pruhs, S., Org. Process. Res. Dev. 2006, 10:441; N-  
 Hidroxibenzotriazol (HOBT, CAS N° 2592-95-2) con un agente deshidratante de carbodiimida, por ejemplo N-N-  
 65 dicitclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), o clorhidrato de 1-etil-3-(3-  
 dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), ver König W., Geiger, R. Chem. Ber., 1970, 103 (3):788: 3-(dietoxifosforilo)-  
 1,2,3-benzotrazin-4(3H)-ona (DEPBT, CAS N° 165534-43-0), ver: Liu, H. et al., Chinese Chemical Letters, 2002,  
 13(7): 601; Cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico; BOP-Cl (CAS 68641-49-6), ver: Diago-Meseguer, J et. al.  
 Synthesis, 1980, 7:547-51 y otros descritos en detalle por Benoiton en Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press,  
 Boca Raton, FL, 2005, Capítulo 2, y el boletín técnico proporcionado por Advanced Automated Peptide Protein  
 Technologies (aapptec), 6309 Shepardsville Rd., Louisville KY 40228, ph 888 692 9111; www.aapptec.com.y  
 referencias en el mismo. Estos métodos crean un enlace de amida estable que une el hapteno al espaciador.  
 Ejemplos de espaciadores que pueden obtenerse usando métodos conocidos y se unen a haptenos que llevan  
 amino utilizando la optimización rutinaria de las condiciones de reacción que emplean los métodos descritos y

citados anteriormente se muestran, pero no están limitados a, los de la Tabla 2. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un portador.

5

Tabla 2

10



15

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

20

25

30

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

35

40

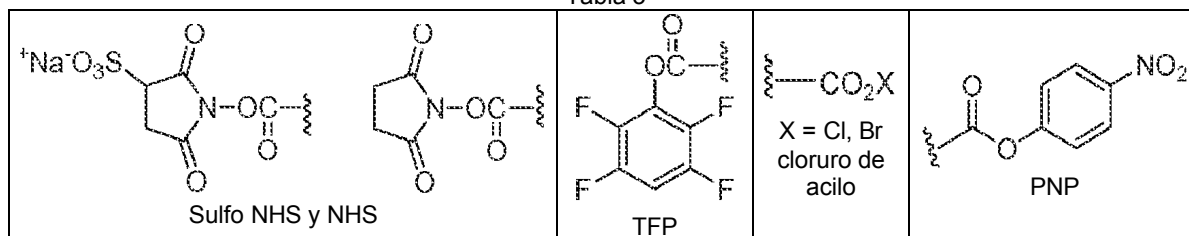
45

Para los haptenos que llevan un grupo de ácido carboxílico, los modos de unión de una porción espaciadora al hapteno incluyen la activación del grupo de ácido carboxílico como un haluro de acilo o éster activo, ejemplos de los cuales se muestran en la Tabla 3, la preparación de los cuales se ha descrito anteriormente, seguido de reacción con un grupo amino (-NH<sub>2</sub>-), hidrazino (-NH-NH<sub>2</sub>-), hidrazido (-C(O)-NH-NH<sub>2</sub>-) o hidroxilo (-OH) en la porción espaciadora para formar un enlace amida, hidrazida, diacilhidracina o éster, o acoplamiento directo del grupo de ácido carboxílico con un grupo amino en la porción espaciadora o directamente en el portador con un reactivo de acoplamiento péptidos y/o reactivo de deshidratación de carbodiimida, descritos anteriormente, ejemplos de los cuales se muestran en las Tablas 4 y 5. Los procedimientos encontrados en las referencias citadas anteriormente para la formación de ésteres activados y el uso de agentes de acoplamiento de péptidos pueden emplearse para la unión de haptenos que llevan ácido carboxílico con bloques de construcción de espaciadores y portadores de proteínas con grupos amino disponibles que utilizan optimización rutinaria de las condiciones de reacción.

50

Tabla 3

55



60

65

Tabla 4

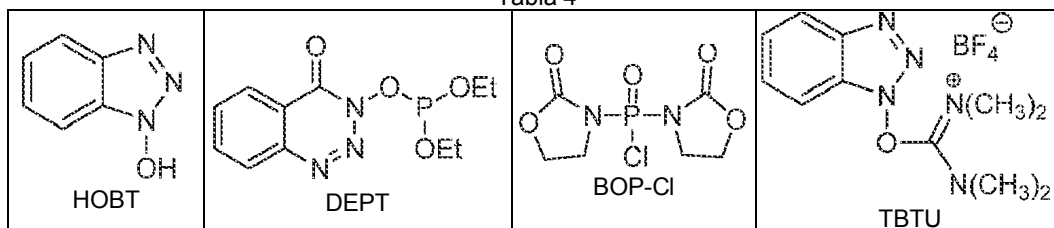
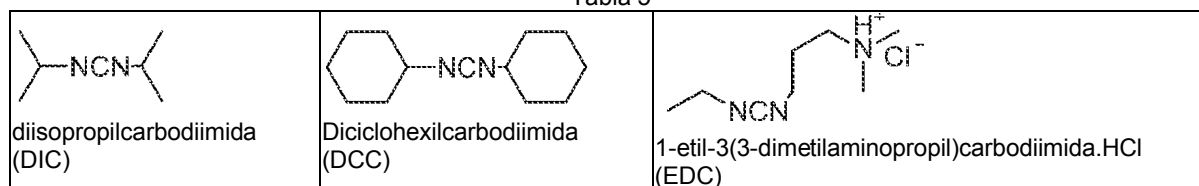
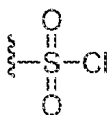


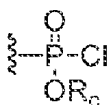
Tabla 5



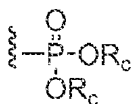
Otros grupos electrófilos pueden estar presentes en el hapteno para unir el espaciador, por ejemplo, un haluro de sulfonilo.



o grupo de fósforo electrófilo, por ejemplo:



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

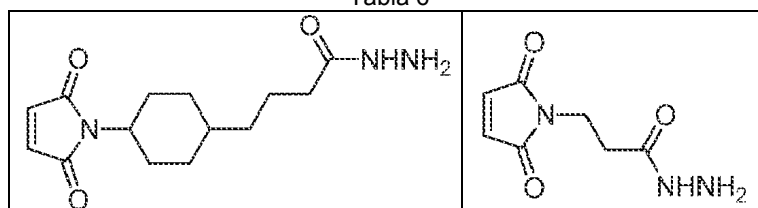


R<sub>c</sub> es alquilo, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo.

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

Los haptenos que contienen grupos aldehído o cetona pueden unirse a los espaciadores usando métodos que incluyen, pero no están limitados a, reacción con un grupo de hidrazida H<sub>2</sub>N-NH-C(O)- en el espaciador para formar una acilhidrazona, ver: Chamow, S.M., Kogan, T.P., Peers, D.H., Hastings, R.C., Byrn, R.A. y Askenaszi, A., J. Biol. Chem., 1992, 267(22):15916. Ejemplos de grupos espaciadores de hidracida bifuncionales que permiten la unión a un grupo tiol en el portador se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6



Los haptenos también pueden contener grupos tiol que pueden reaccionar con el portador siempre que el vehículo se haya modificado para proporcionar un grupo que pueda reaccionar con el tiol. Los grupos portadores

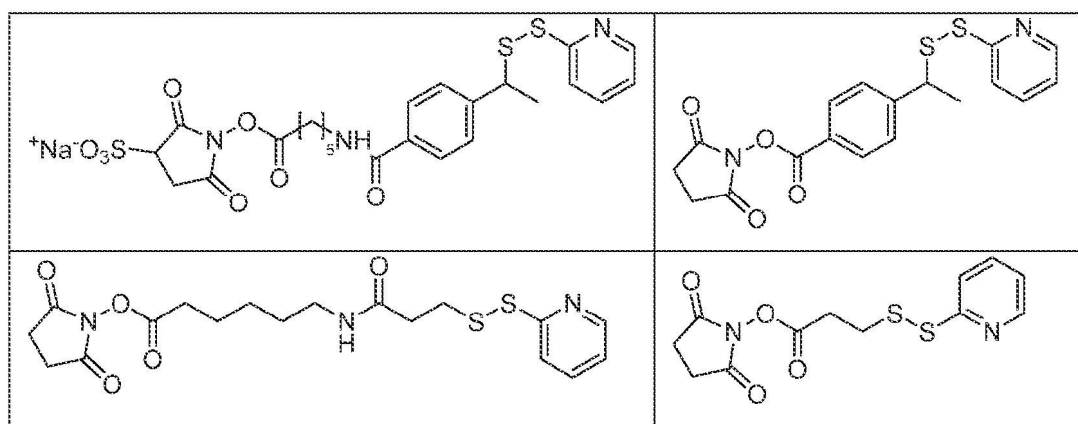


5 pueden modificarse mediante métodos que incluyen, pero no están limitados a, la unión de un grupo que contiene un grupo funcional maleimida mediante reacción de un grupo amino en el portador con maleimidoacetato de N-succinimidilo, (AMAS, CAS N° 55750-61-3), yodoacetato de succinimidilo (CAS N° 151199-81-4), o cualquiera de los grupos espaciadores bifuncionales mostrados en la Tabla 1 para introducir un grupo que puede experimentar una reacción que dé como resultado la unión del hapteno al portador.

10 El grupo de enlace funcional capaz de formar un enlace con el portador puede ser cualquier grupo capaz de formar un enlace estable y puede ser reactivo para una serie de grupos diferentes en el portador. El grupo de enlace funcional puede reaccionar preferiblemente con un grupo amino, un grupo de ácido carboxílico o un grupo tiol en el portador, o un derivado de los mismos. Ejemplos no limitativos del grupo de enlace funcional son un grupo de ácido carboxílico, haluro de acilo, éster activo (como se ha definido anteriormente), isocianato, isotiocianato, haluro de alquilo, grupo amino, grupo tiol, grupo maleimida, grupo acrilato ( $H_2C=CH-C(O)-$ ) o grupo vinil sulfona  $H_2C=CH-SO_2-$  Ver: Park, J.W., et al., Bioconjugate Chem., 2012, 23(3):350. El grupo de enlace funcional puede estar presente como parte de un bloque de construcción espaciador activado diferencialmente que puede hacerse reaccionar de manera escalonada con el hapteno y el derivado de hapteno resultante puede hacerse reaccionar luego con el portador. Alternativamente, el hapteno se puede derivatizar con un espaciador que lleva un grupo precursor que se puede transformar en el grupo de enlace funcional mediante una reacción posterior. Cuando el grupo de enlace funcional en el espaciador es un grupo amina o de ácido carboxílico, la reacción de acoplamiento con el grupo de ácido carboxílico o la amina en el portador puede llevarse a cabo directamente mediante el uso de reactivos de acoplamiento de péptidos de acuerdo con los procedimientos en las referencias citadas anteriormente para estos reactivos.

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

Tabla 7



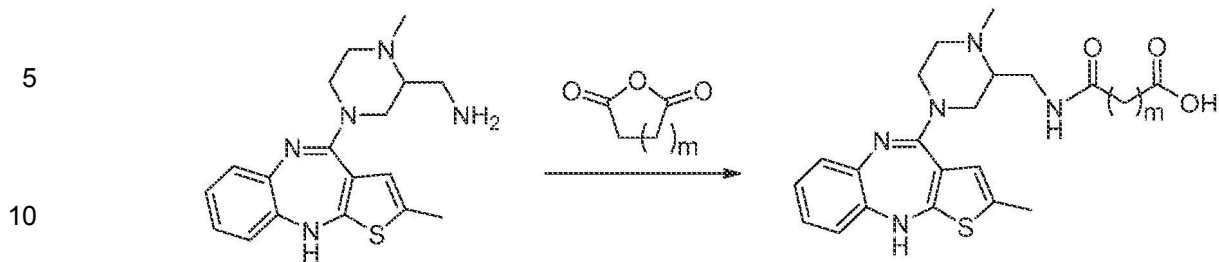
50 Más a menudo, el portador es una proteína y para la unión pueden usarse grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina, ya sea directamente por reacción con un grupo de enlace funcional reactivo con amina o después de la derivatización con un grupo que contiene tiol, incluyendo N-succinimidil S-Acetiltoacetato, (SATA, CAS 76931-93-6), o un análogo de los mismos, seguido de la escisión del grupo acetato con hidroxilamina para exponer el grupo tiol para la reacción con el grupo de enlace funcional en el hapteno. Los grupos tiol también pueden introducirse en el portador mediante la reducción de enlaces disulfuro dentro de portadores de proteínas con reactivos reductores suaves que incluyen, entre otros, 2-mercaptoetilamina, ver: Bilah, M., et al., Bioelectrochemistry, 2010, 80(1):49, reactivos de fosfina, ver: Kirley, T.L., Analytical Biochemistry, 1989, 180(2):231 o ditioeritrol (DTT, CAS 3483-12-3) Cleland, W., Biochemistry, 1964, 3:480-482.

### ESQUEMAS GENERALES DE REACCIÓN

60 Los compuestos representativos de la presente invención se pueden sintetizar de acuerdo con los métodos sintéticos generales descritos a continuación. Los compuestos de Fórmula (I) se pueden preparar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se pretende que los siguientes esquemas de reacción representen solo ejemplos de la invención y no se pretende de ninguna manera que sean un límite para la invención.

65

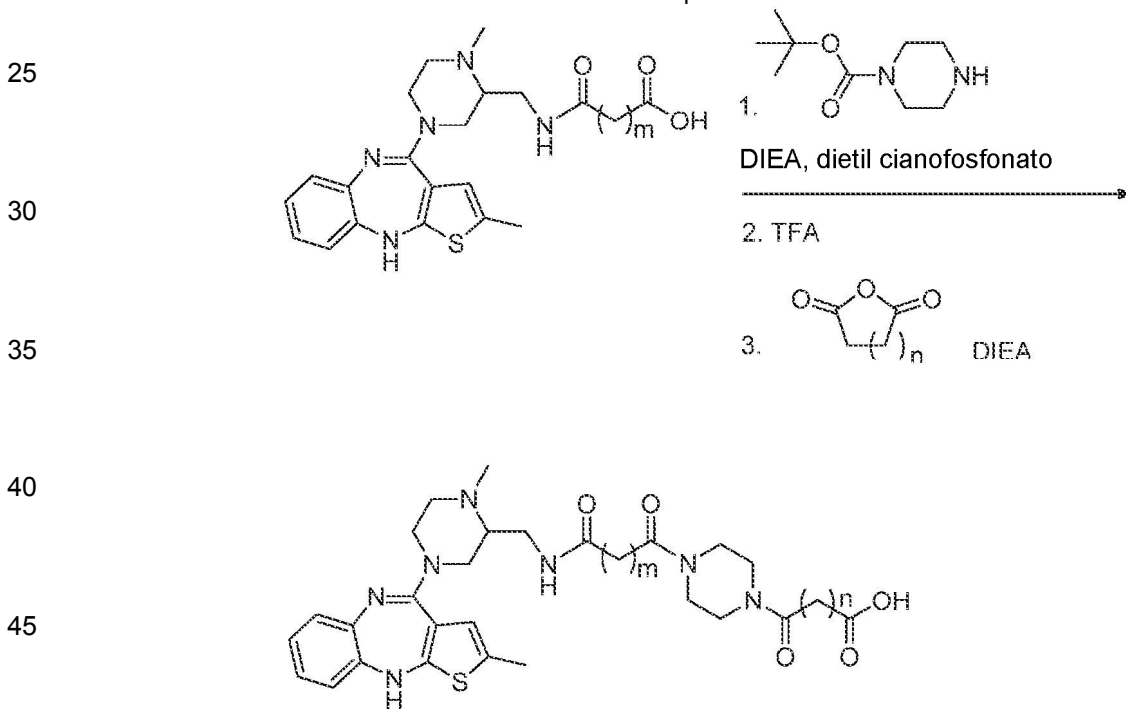
Esquema 1



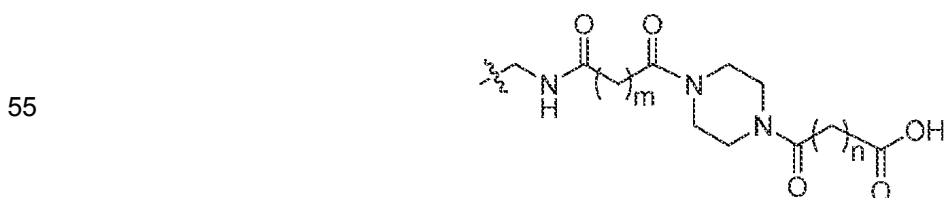
15 Los compuestos de Fórmula I en donde R<sup>2</sup> es CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H pueden prepararse de acuerdo con el Esquema 1. La reacción de (1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metanamina, preparada como se describe en el Ejemplo 1, Paso I, procede con un compuesto de anhídrido cíclico, como anhídrido succínico o anhídrido glutárico, en un solvente como la piridina, a temperaturas que varían desde temperatura ambiente hasta 60° C, durante aproximadamente 48 horas. Los expertos en la técnica reconocerán que se puede usar la misma química para crear compuestos de Fórmula I en los que R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H.

20

Esquema 2



50 Compuestos de fórmula I en los que R<sup>2</sup> es

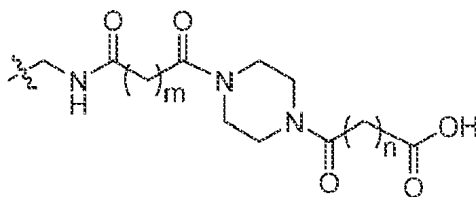


60 pueden elaborarse de acuerdo con el Esquema 2. Los compuestos de Fórmula I, en los que R<sup>2</sup> es CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, preparados como se describe en el Esquema 1, se tratan con *N-t*-butoxicarbonilpiperazina, dietil cianofosfonato y una base, como la diisopropiletilamina. La reacción se lleva a cabo en un solvente, como diclorometano, durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La desprotección del grupo piperazinilo se realiza con anhídrido trifluoroacético como se describe en el Esquema 2, seguido de la reacción con un anhídrido

65

apropiado, como anhídrido succínico o anhídrido maleico, en presencia de una base adecuada como diisopropiletilamina. Los expertos en la técnica reconocerán que puede usarse la misma química para crear compuestos de Fórmula I en los que R<sup>1</sup> es

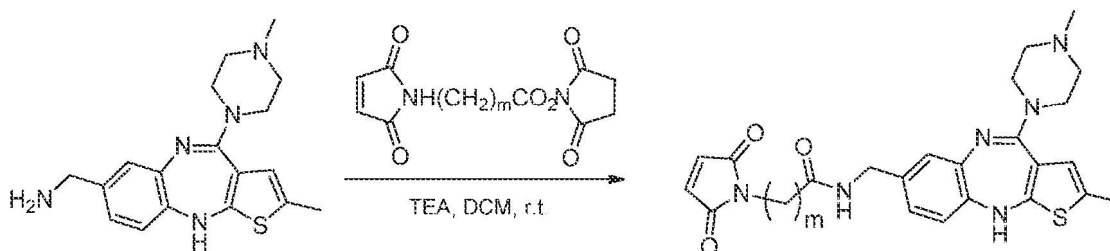
5



10

Esquema 3

15

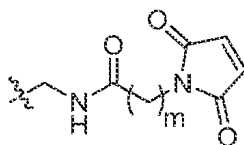


20

25

Compuestos de Fórmula I en los que donde R<sup>1</sup> es

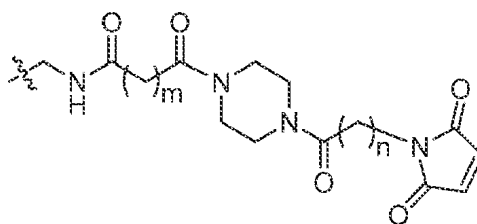
30



35

pueden elaborarse de acuerdo con el Esquema 3. La maleimida puede introducirse por cualquier método conocido en la técnica. Los grupos de funcionalización de maleimida, como 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, donde m es 1, pueden usarse en un solvente como DMF o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y una base, como tributilamina o trietilamina. Alternativamente, el grupo piperazinilo desprotegido descrito en el Esquema 2 puede elaborarse con una funcionalidad de maleimida, como se describe en el Esquema 3 para dar compuestos de Fórmula I en donde R<sup>1</sup> es

40

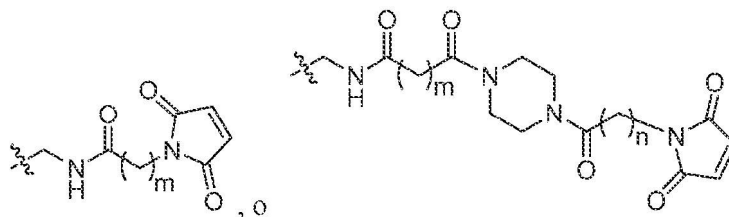


45

50

Los expertos en la técnica reconocerán que se puede usar la misma química para crear compuestos de Fórmula I en los que R<sup>2</sup> es

55



60

Los compuestos en los que el espaciador y el grupo de enlace están unidos al nitrógeno secundario no sustituido en el anillo de diazepina de la olanzapina pueden obtenerse mediante las reacciones representadas en los esquemas 4 a 8. La acilación del nitrógeno se describe en Bioorganic and Med. Chem. Letters, 2006, 16:4548. El uso del cloruro de mono ácido mono éster de ácido succínico en presencia de una base, bajo condiciones anhidras

65

en un solvente aprótico, proporciona un intermedio, cuya funcionalidad éster puede hidrolizarse usando condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, base acuosa, para proporcionar un hapteno que puede elaborarse adicionalmente en un inmunógeno mediante métodos descritos anteriormente en la presente e ilustrados por los ejemplos de esta divulgación.

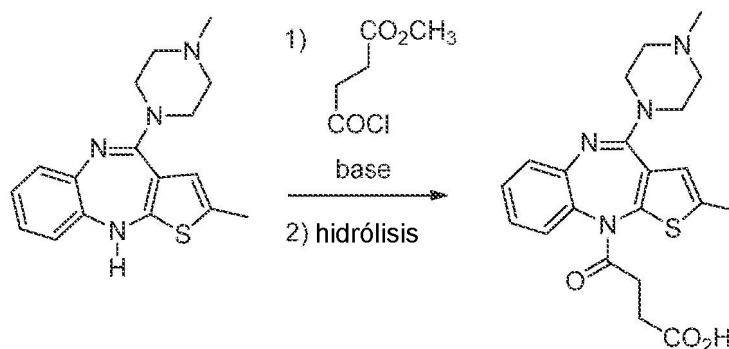
5

Esquema 4

10

15

20



Su, et.al., anterior, también informan sobre la preparación de sulfonamidas. Mediante el uso de un cloruro de sulfonilo funcionalizado en presencia de una base, bajo condiciones anhidras en un solvente aprótico, como se muestra en el Esquema 5, puede prepararse un hapteno carboxi y transformarlo en un inmunógeno mediante métodos descritos anteriormente en la presente e ilustrados con ejemplos de esta divulgación.

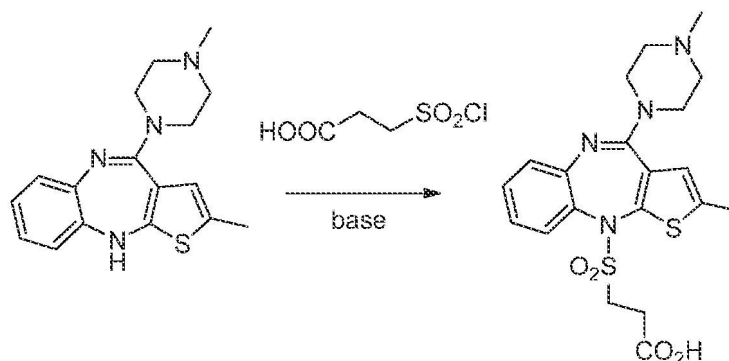
25

Esquema 5

30

35

40

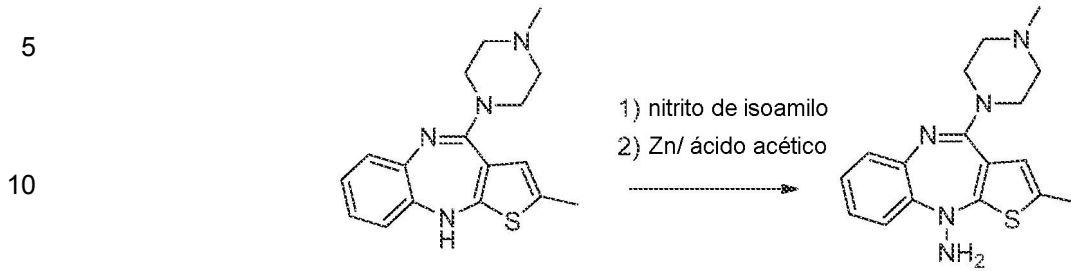


Su, et al., anterior, también enseñan métodos para la preparación de una hidracina como se muestra en el Esquema 6, a través de la diazotización del nitrógeno del anillo con un éster de nitrito seguido de la reducción con zinc en ácido acético. La hidracina resultante puede funcionalizarse adicionalmente de varias maneras, como se muestra en el Esquema 7. La reacción con un bloque de construcción espaciador bifuncional, por ejemplo AMAS, en presencia de una base de amina, por ejemplo, tributilamina, en un solvente como DMF como se ha descrito en otra parte en la presente, puede proporcionar un hapteno de maleimida que puede unirse a un portador a través de la reacción con un grupo tiol. La sulfonilación en presencia de una base con un cloruro de sulfonilo funcionalizado, por ejemplo, cloruro de m-carboxibencenosulfonilo puede proporcionar una sulfonilhidracida que contiene un grupo carboxi para la unión a un portador mediante métodos descritos anteriormente en la presente e ilustrados por ejemplos de esta divulgación. Adicionalmente, la hidrazina se puede hacer reaccionar con un aldehído o cetona funcionalizado, por ejemplo, ácido levulínico, como se describe en la US4022780, con una cantidad catalítica de ácido en condiciones donde se elimina el agua generada por la condensación, para proporcionar una hidrazona como se muestra en el esquema 7. La hidrazona puede reducirse posteriormente usando cianoborohidruro de sodio en el método de Su, J. et al. anteriormente referenciado, para proporcionar un derivado saturado.

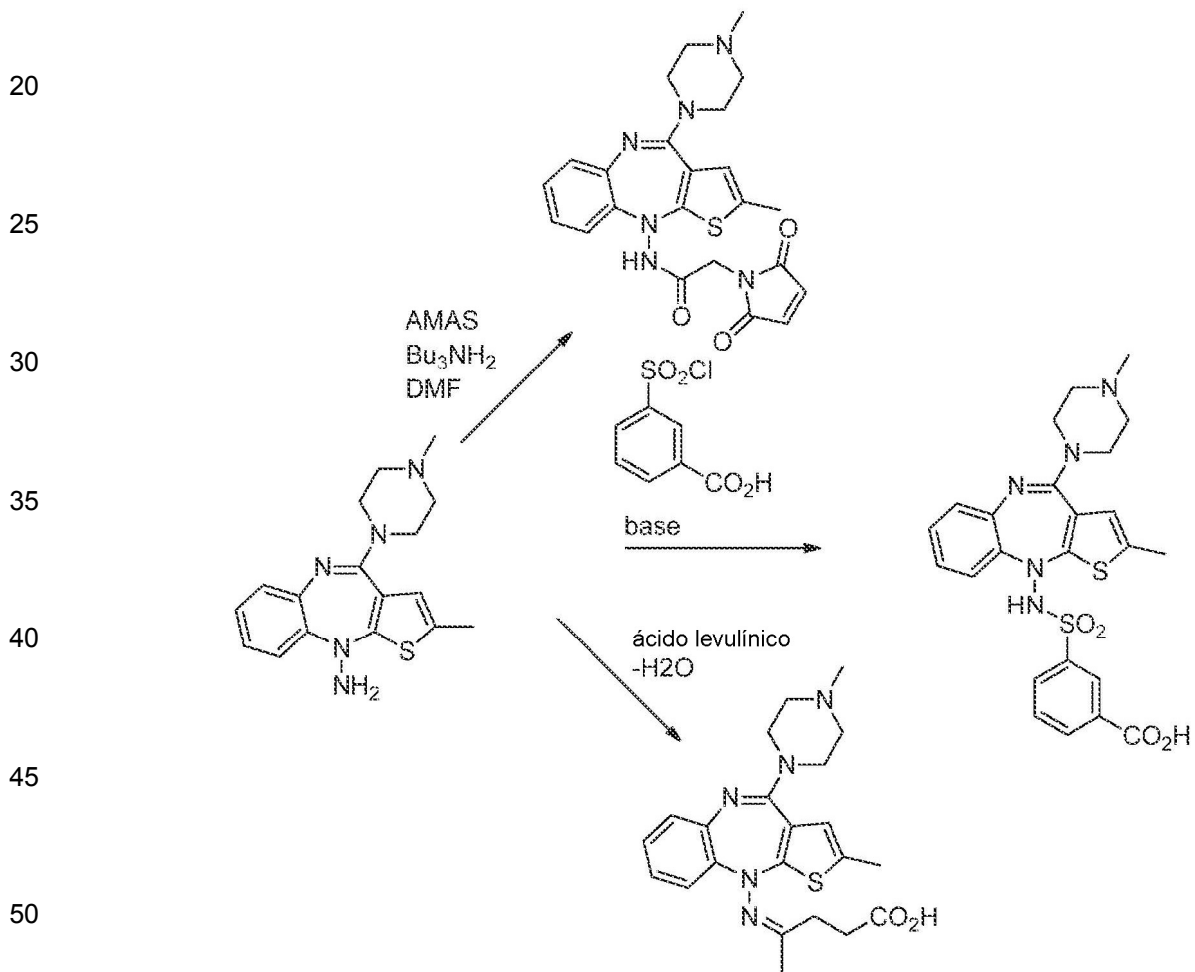
60

65

Esquema 6



Esquema 7



55 La alquilación directa del nitrógeno del anillo como se muestra en el Esquema 8, también puede lograrse usando el método descrito en la US6034078 para añadir un grupo alquilo directamente a la olanzapina. Aunque con el uso de un haluro de alquilo funcionalizado, por ejemplo, 4-clorometilbutirato, se puede obtener un intermedio que, mediante hidrólisis usando condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica, puede proporcionar un hapteno que puede elaborarse adicionalmente en un inmunógeno mediante métodos descritos anteriormente en la presente e

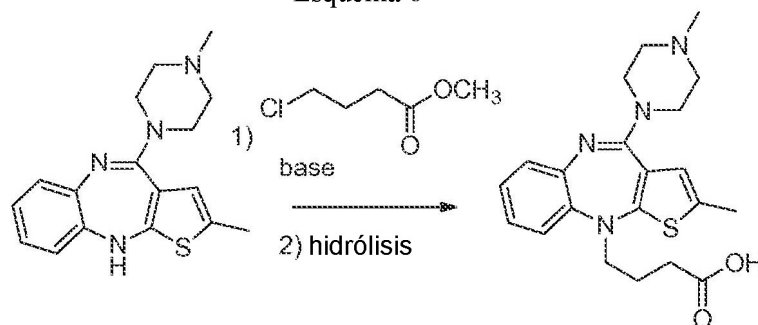
60 ilustrados por los ejemplos de esta divulgación.

Esquema 8

5

10

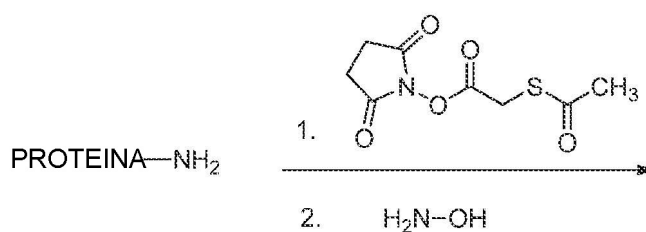
15



Esquema 9

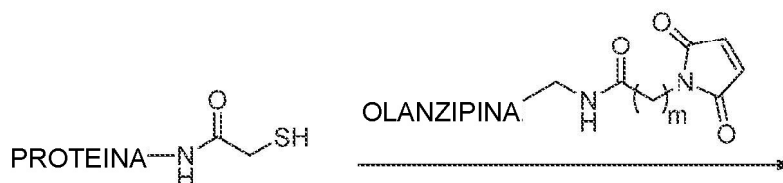
20

25

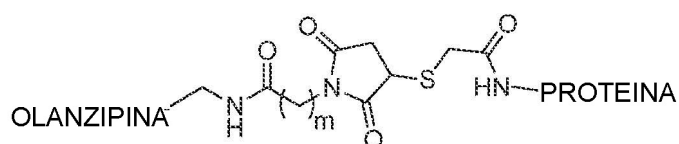


30

35



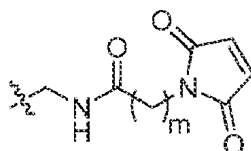
40



45

Los haptenos funcionalizados con maleimida en los que R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> es

50

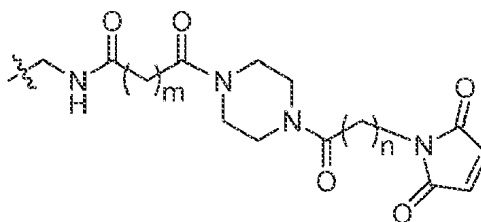


55

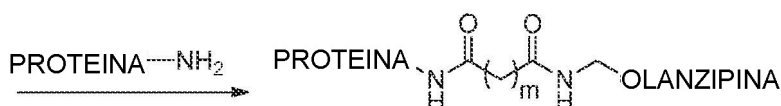
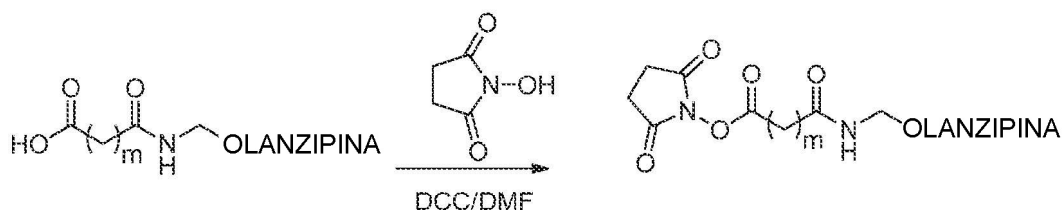
60

pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 9. La activación de residuos de lisina de proteína por acilación del épsilon-nitrógeno con N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), seguido de la hidrólisis posterior del grupo S-acetilo con hidroxilamina. Un grupo sulfhidrilo nucleófilo. La conjugación de la proteína activada con sulfhidrilo con el hapteno derivado de maleimida (preparado como se describe en el esquema general 3) se realiza mediante una reacción de adición de Michael. Las proteínas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina. La misma metodología puede usarse para conjugar proteínas con haptenos funcionalizados con maleimida en los que R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> es

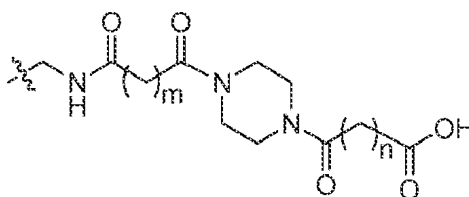
65



Esquema 10:



Haptenos funcionalizados con ácido carboxílico, en los que  $R^1$  o  $R^2$  es  $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2\text{)}_m\text{CO}_2\text{H}$ , pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 10. La reacción con N-hidroxisuccinimida y un agente de acoplamiento adecuado, como diciclohexilcarbodiimida, y una base, como tributilamina, en un solvente como DMF, a una temperatura de aproximadamente  $20^\circ\text{C}$ , durante aproximadamente 18 horas activa el ácido carboxílico con el grupo saliente de hidroxipirroidina-2,5-diona. El conector activado y el hapteno pueden conjugarse con una proteína en un solvente, como un tampón de fosfato de pH 7,5, a aproximadamente  $20^\circ\text{C}$ , durante aproximadamente 2,5 horas. Las proteínas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina. La misma metodología puede usarse para conjugar proteínas con haptenos funcionalizados con ácido carboxílico den los que  $R^1$  o  $R^2$  es



## PRODUCCION DE ANTICUERPOS

Los conjugados anteriores son útiles para la producción de anticuerpos que se unen al fármaco antipsicótico al que se generaron (olanzapina). Estos anticuerpos pueden usarse en ensayos para detectar la presencia y/o la cantidad del fármaco antipsicótico en muestras de pacientes. Dicha detección permite la monitorización de fármacos terapéuticos permitiendo todos sus beneficios. La detección de niveles de fármacos antipsicóticos puede ser útil para muchos propósitos, incluyendo: detección en combinación con la detección de otros fármacos antipsicóticos, incluyendo aquellos seleccionados del grupo que consiste de risperidona, paliperidona, quetiapina, aripiprazol y metabolitos de los mismos, tal detección permitiendo la medición simultánea de estos fármacos antipsicóticos; determinación de la adherencia o el cumplimiento del paciente con la terapia prescrita; uso como una herramienta de decisión para determinar si un paciente debe pasarse de un régimen antipsicótico oral a un régimen antipsicótico inyectable de acción prolongada; uso como una herramienta de decisión para determinar si el nivel de dosis o el intervalo de dosificación de los antipsicóticos orales o inyectables debe aumentarse o disminuirse para garantizar el logro o el mantenimiento de niveles de fármaco eficaces o seguros; uso como una ayuda en el inicio de la terapia con fármacos antipsicóticos proporcionando evidencia del logro de niveles de pK mínimos; uso para determinar la bioequivalencia de los fármacos antipsicóticos en formulaciones múltiples o de múltiples fuentes; uso para evaluar el impacto de la polifarmacia y las posibles interacciones fármaco-fármaco; y uso como una indicación de que un paciente debería excluirse de o incluirse en una prueba clínica y como una

ayuda en la monitorización posterior del cumplimiento con los requisitos de medicación de la prueba clínica.

5           Habiendo proporcionado los conjugados de la presente invención, que comprenden los compuestos de la presente y un portador inmunogénico, pueden generarse anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados, que se unen al fármaco antipsicótico. Tales anticuerpos que se contemplan particularmente incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, así como también fragmentos de los mismos, por ejemplo, proteínas recombinantes, que contienen el dominio de unión al antígeno y/o una o más regiones determinantes de la complementariedad de estos anticuerpos. Preferiblemente, el anticuerpo se unirá al fármaco y a cualquier metabolito farmacológicamente activo deseado. Alterando la localización de la unión de un portador inmunogénico en un conjugado de fármaco, se pueden diseñar la selectividad y la reactividad cruzada con metabolitos y/o fármacos relacionados en los anticuerpos. Para la olanzapina, la reactividad cruzada con el fármaco relacionado clozapina puede o no ser deseable, y la reactividad cruzada con los metabolitos de la olanzapina como 10-N-glucronida o 4-N-desmetil olanzapina puede o no ser deseable. Pueden generarse anticuerpos que detectan múltiples de estos fármacos y/o metabolitos, o pueden generarse anticuerpos que detectan cada uno por separado (definiendo por tanto las propiedades de "unión específica" del anticuerpo). Un anticuerpo se une específicamente a uno o más compuestos cuando su unión de uno o más compuestos es equimolar o sustancialmente equimolar.

20           Los métodos para producir tales anticuerpos comprenden inocular un huésped con el conjugado (el compuesto y el portador inmunogénico siendo un inmunógeno) que incorporan características de la presente invención. Los huéspedes adecuados incluyen, pero no están limitados a, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, conejos, pollos, burros, caballos, monos, chimpancés, orangutanes, gorilas, humanos y cualquier especie capaz de desarrollar una respuesta inmune madura. Los procedimientos de inmunización están bien establecidos en la técnica y se exponen en numerosos tratados y publicaciones incluyendo "The Immunoassay Handbook", 2ª edición, editado por David Wild (Nature Publishing Group, 2000) y las referencias citadas en el mismo.

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

30           Los anticuerpos policlonales pueden generarse en un huésped mamífero mediante una o más inyecciones de un inmunógeno que puede administrarse opcionalmente junto con un adyuvante. Típicamente, un inmunógeno o una combinación de un inmunógeno y un adyuvante se inyecta en un huésped mamífero mediante una o múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Preferiblemente, el programa de inmunización se lleva a cabo durante por lo menos una semana, y más preferiblemente, durante dos o más semanas. Los anticuerpos policlonales producidos de esta manera pueden aislarse y purificarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

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

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

45           Los linfocitos pueden fusionarse con una línea celular inmortalizada para formar células de hibridoma, un proceso que puede facilitarse mediante el uso de un agente de fusión, por ejemplo, polietilenglicol. A modo de ilustración, se pueden usar células de mieloma de roedor, bovinos o humanos mutantes inmortalizadas mediante transformación. Se prefieren poblaciones sustancialmente puras de células de hibridoma, en oposición a células inmortalizadas no fusionadas. Por tanto, después de la fusión, las células pueden cultivarse en un medio adecuado que inhiba el crecimiento o la supervivencia de células inmortalizadas no fusionadas, por ejemplo, usando células de mieloma mutantes que carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). En tal caso, se pueden añadir hipoxantina, aminopterina y timidina al medio (medio HAT) para prevenir el crecimiento de células deficientes en HGPRT mientras se permite que crezcan los hibridomas.

50           Preferiblemente, las células inmortalizadas se fusionan eficazmente, pueden aislarse de poblaciones mixtas mediante selección en un medio como HAT, y soportan una expresión estable y de alto nivel de anticuerpo después de la fusión. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas incluyen líneas celulares de mieloma disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

60           Como las células de hibridoma típicamente secretan anticuerpos extracelularmente, los medios de cultivo



pueden analizarse para la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para el fármaco antipsicótico. La inmunoprecipitación de los ensayos de unión in vitro, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), puede usarse para medir la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales.

5 Las células de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales pueden aislarse como clones individuales limitando los procedimientos de dilución y subcultivarse. Los medios de cultivo adecuados incluyen, pero no están limitados a, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco, RPMI-1640, y medios libres de polipéptidos, reducidos de polipéptidos o libres de suero, por ejemplo, Ultra DOMA PF o HL-1, disponibles de Biowhittaker, Walkersville MD  
10 Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo como ascitis.

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

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos recombinantes como los que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.166.452. El ADN que codifica anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se unen específicamente a los genes de cadenas de anticuerpos pesadas y ligeras murinos, preferiblemente a la sonda de ADN aislada de líneas de células de hibridoma de anticuerpos monoclonales que secretan anticuerpos específicos para fármacos antipsicóticos.

## INMUNOENSAYOS

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

También se puede proporcionar un kit de reactivo que comprende un anticuerpo como se ha descrito anteriormente. Un kit de reactivo representativo puede comprender un anticuerpo que se une al fármaco antipsicótico, olanzapina, un complejo que comprende un análogo de un fármaco antipsicótico o un derivado del mismo acoplado a una fracción de marcado, y también puede comprender opcionalmente uno o más calibradores que comprenden una cantidad conocida de un fármaco antipsicótico o un estándar relacionado.

Como se ha indicado anteriormente, los kits de reactivos pueden comprender calibradores y/o materiales de control que comprenden una cantidad conocida del analito a medir. La concentración del analito puede calcularse comparando los resultados obtenidos para una muestra con los resultados obtenidos para un estándar. Se puede construir una curva de calibración y usarla para relacionar los conjuntos de resultados y para determinar la concentración de un analito en una muestra.

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

50 Las solicitudes pendientes de tramitación tituladas "Haptens of Aripiprazole" (N° de Expediente del Apoderado PRD3265USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Haptens of Olanzapine" (N° de Expediente del Apoderado PRD3266USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Haptens of Paliperidone" (N° de Expediente del Apoderado PRD3267USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Haptens of Quetiapine" (N° de Expediente del Apoderado PRD3268USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Haptens of Risperidone and Paliperidone" (N° de Expediente del Apoderado PRD3269USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Antibodies to Aripiprazole Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5128USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Olanzapine Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5132USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Paliperidone Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5126USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Quetiapine Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5134USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Risperidone Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5130USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Aripiprazole and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5129USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Olanzapine and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5133USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko),  
65 "Antibodies to Paliperidone and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5127USPSP, primer inventor

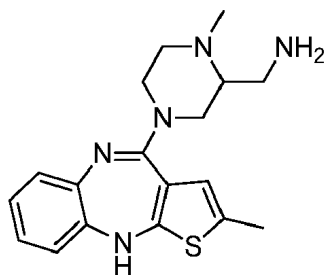
nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Quetiapine and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5135USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Risperidone and Use Thereof" (N° de Expediente del Apoderado CDS5131USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko).

## 5 EJEMPLOS

Los compuestos representativos de la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos sintéticos generales descritos a continuación. Los compuestos de Fórmula (I) pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los siguientes ejemplos solo pretenden representar ejemplos de la invención y no se pretende de ninguna manera que limiten la invención.

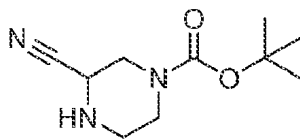
### Ejemplo 1

(1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metanamina



### Paso A

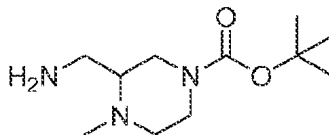
3-cianopiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo



A una solución de 3-cianopiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo (21,1 g, 0,1 mol) y formaldehído acuoso (24 g, 37% en agua) en THF se le añadió cianoborohidruro de sodio (31,5 g, 0,5 mol) en porciones pequeñas. La mezcla de la reacción se envejeció a temperatura ambiente durante la noche, luego se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con cloruro de sodio acuoso saturado, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD) δ 4.23-4.18 (m, 1H), 4.01-3.97 (br, 1H), 3.92-3.90 (br, 1H), 2.92-2.89 (br, 1H), 2.88-2.87 (br, 1H), 2.65-2.62 (m, 1H), 2.378 (s, 3H), 2.36-2.33 (m, 1H), 1.47 (s, 9H).

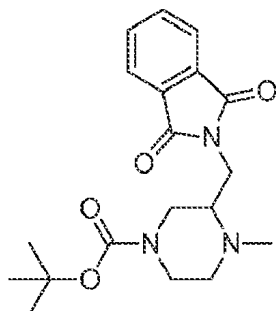
### Paso B

3-(aminometil)-4-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo



A una solución de 3-ciano-4-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo preparada como se describe en el Paso A, (10,5 g, 47 mmol) en metanol (200 ml) se le añadió níquel metálico (10 g) y trietilamina (5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de gas de hidrógeno (50 psi). Tras el consumo de 3-ciano-4-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar 3-(aminometil)-4-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo bruto usado en el paso siguiente sin purificación.

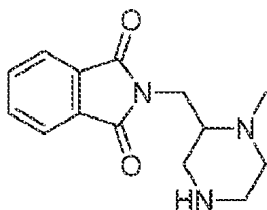
### Paso C

3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-4-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo

A una mezcla de 3-(aminometil)-4-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo, preparada como se describe en el paso anterior, (5,5 g, bruto) y bicarbonato de sodio (2,52 g, 30 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) se añadió una solución de ácido 2*H*-isoindol-2-carboxílico, 1,3-dihidro-1,3-dioxo, éster etílico (6,59 g, 30 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 30 minutos, la suspensión se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar un producto bruto que se purificó por cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título.  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, MeOD)  $\delta$  7.87-7.85 (m, 2H), 7.87-7.80 (m, 2H), 3.94-3.90 (m, 1H), 3.75-3.65 (br, 3H), 3.43-3.41 (br, 1H), 3.30-3.28 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 2.39-2.38 (m, 1H), 2.30-2.28 (m, 1H), 1.36 (s, 9H).

## Paso D

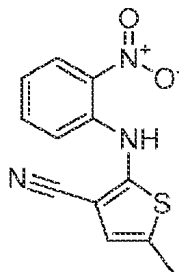
## 2-((1-Metilpiperazin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona



Una solución de 3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-4-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo, preparada como se describe en el paso anterior, (8,6 g) en cloruro de hidrógeno metanólico (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se eliminó al vacío para proporcionar 2-((1-metilpiperazin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional.  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, MeOD)  $\delta$  7.88-7.86 (m, 2H), 7.82-7.80 (m, 2H), 3.99-3.95 (m, 1H), 3.77-3.73 (m, 1H), 3.24-3.23 (m, 1H), 3.29-3.23 (m, 1H), 3.17-3.14 (m, 1H), 3.04-2.84 (m, 2H), 2.81-2.78 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.46-2.40 (m, 1H).

## Paso E

## 5-metil-2-((2-nitrofenil)amino)tiofeno-3-carbonitrilo



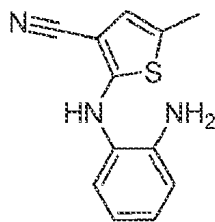
A una solución de 2-amino-5-metiltiofeno-3-carbonitrilo (13,8 g, 100 mmol) y 1-fluoro-2-nitrobenzoceno (16,92 g, 120 mmol) en dimetilsulfóxido se le añadió hidróxido de potasio (11,2 g, 200 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con agua y la suspensión resultante se filtró. La torta filtrada se secó para dar 5-metil-2-((2-nitrofenil)amino)tiofeno-3-carbonitrilo como un sólido rojo usado sin purificación adicional.  $^1\text{H NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.69 (s, 1H), 8.27-8.25 (m, 1H), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.23-7.20 (m, 1H), 7.0-6.96 (m, 1H), 6.80 (s, 1H), 2.49(s, 3H).

## Paso F

## 2-((2-aminofenil)amino)-5-metiltiofeno-3-carbonitrilo

5

10



15

20

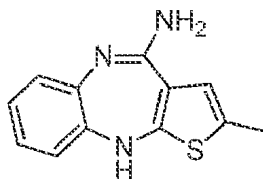
A una solución de 5-metil-2-((2-nitrofenil)amino)tiofeno-3-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (43,3 g, 0,157 mol) en acetato de etilo (500 ml) se añadió 10% de paladio sobre carbono (8 g). La mezcla negra se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de gas de hidrógeno. Cuando la LCMS mostró que la mayor parte del 5-metil-2-((2-nitrofenil)amino)tiofeno-3-carbonitrilo se había consumido completamente, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar 2-((2-aminofenil)amino)-5-metiltiofeno-3-carbonitrilo.  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.29-7.21 (m, 1H), 7.11-7.10 (m, 1H), 6.86-6.79 (m, 2H), 6.48-6.47 (m, 1H), 6.42 (brs, 1H), 3.75-3.70 (br, 2H), 2.28 (s, 3H).

## Paso G

## 2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-amina

25

30



35

Una mezcla de 2-((2-aminofenil)amino)-5-metiltiofeno-3-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (22,9 g, 100 mmol) en isopropanol (150 ml) y ácido clorhídrico acuoso (50 ml, 18%) se calentó a 80° C durante 3 horas. La suspensión resultante se filtró y la torta del filtrado se secó para dar el compuesto del título como un sólido rojo.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.14-7.12 (t, 1H), 7.7.12-7.10 (t, 1H), 6.95-6.93 (d,  $J = 8\text{MHz}$ , 1H), 6.81-6.79 (d,  $J = 8\text{MHz}$ , 1H), 6.70 (s, 1H), 2.30 (s, 3H).

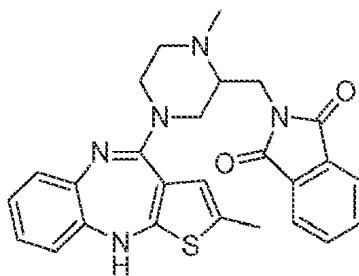
## Paso H

40

## 2-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona

45

50



55

60

Una solución de 2-((1-metilpiperazin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona, preparada como se describe en el paso D, (100 mg, 0,38 mmol), 2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-amina, preparada como se describe en el paso G, (150 mg, 0,52 mmol) y diisopropiletilamina (0,49 g, 3,8 mmol) en dimetilsulfóxido (0,5 ml) se agitó a 170° C durante 2 horas. La reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se concentró y el residuo se purificó por columna para dar 15 mg de 2-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.76-7.73 (m, 1H), 7.45-7.35 (m, 3H), 7.18-7.17 (m, 1H), 6.98-6.95 (m, 2H), 6.75-6.73 (m, 1H), 6.46 (s, 1H), 4.28-4.25 (m, 1H), 3.96-6.92 (m, 1H), 3.71-3.64 (m, 3H), 3.47-3.41 (m, 1H), 3.29-3.28 (m, 1H), 3.12-3.09 (m, 1H), 2.87-2.86 (m, 1H), 2.67-2.53 (m, 3H), 2.28 (s, 3H).

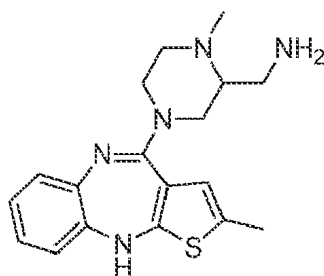
## Paso I

65

## (1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metanamina

5

10



15

20

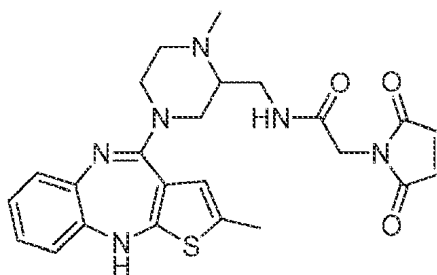
Una solución de 2-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metilo)isoindolina-1,3-diona, preparada como se describe en el paso anterior, (1,0 g) en metilamina etanólica (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó por HPLC para dar la sal de clorhidrato de (1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metanamina como un sólido rojo.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7.46-7.44 (m, 1H), 7.31-7.48 (m, 1H), 7.19-7.15 (m, 1H), 6.97-6.95 (m, 1H), 6.74 (s, 1H), 4.80-4.71 (br, 1H), 4.28-4.20 (br, 2H), 4.07-4.04 (br, 2H), 3.82-3.70 (br, 3H), 3.53-3.48 (m, 1H), 3.18 (s, 3H), 2.42(m, 3H); ESI-MS (M+1): 342 calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{S}$  Masa Exacta: 341.17.

## Ejemplo 2

25

2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metil)acetamida

30



35

40

A una solución de (1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metanamina, preparada como se describe en el Ejemplo 1, (10,3 mg, 30,2  $\mu\text{moles}$ ) en 570  $\mu\text{l}$  de DMF y 13,3  $\mu\text{l}$  de tributilamina se añadieron 760  $\mu\text{l}$  de una solución de DMF de éster de N-( $\alpha$ -maleimidoacetoxi) succinimida (AMAS, 10 mg/ml, 7,6 mg, 30,2  $\mu\text{moles}$ ). La solución resultante se dejó agitar durante 18 horas a 20° C, luego se usó como tal en reacciones de conjugación con proteína activada por tiol.

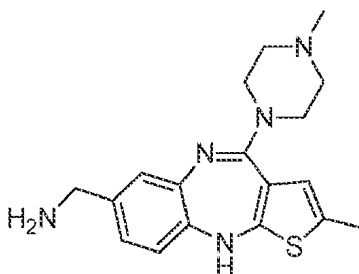
## Ejemplo 3

45

(2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metanamina

50

55

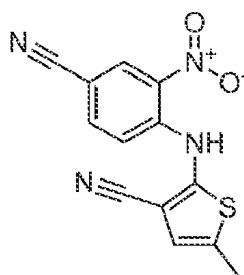


## Paso A

60

2-(4-ciano-2-nitro-fenilamino)-5-metil-tiofeno-3-carbonitrilo

65



5

10

15

20

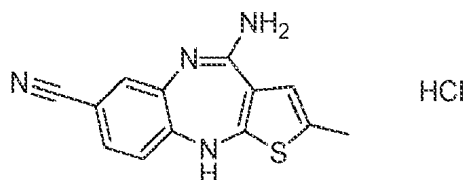
A una suspensión de hidruro de sodio (60%, 0,58 g) en THF (2 ml), se añadió 4-fluoro-3-nitro-benzonitrilo (1,33 g, 8,0 mmol) y 2-amino-5-metil-tiofeno-3-carbonitrilo (1,10 g, 8,0 mmol) en THF (10 ml), gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron dos lotes más de hidruro de sodio (60%, 0,50 g y 0,4 g) durante las siguientes 6 horas. Después de agitar durante 3 días, la mezcla se vertió en agua con hielo (20 ml) y se acidificó a pH 3 con ácido clorhídrico 6N (7 ml). El precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido se extrajo con diclorometano (35 ml). La solución se concentró hasta obtener un sólido, y se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. LC-MS: m/z 285 (M+1), 307 (M+23). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 9.76 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.70 (d, 1H), 7.14 (d, 1H), 6.87 (s, 1H), 2.52 (s, 1H).

Paso B

Clorhidrato de 10-amino-2-metil-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azuleno-7-carbonitrilo

25

30



A una suspensión de 2-(4-ciano-2-nitro-fenilamino)-5-metil-tiofeno-3-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (0,52 g) en etanol (5 ml), se le añadió cloruro de estaño (1,36 g, 7,2 mmol) en HCl 6N. La mezcla se calentó en un baño de aceite a 85° C durante 3 horas y luego se enfrió en un baño de hielo. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó hasta obtener el compuesto del título como un sólido marrón que contenía sal inorgánica, que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. LC-MS: m/z 255 (M+1 of free base). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 11.18 (br, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.35 (br, 1H), 8.94 (br, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.95 (d, 1H), 2.26 (s, 3H).

40

40

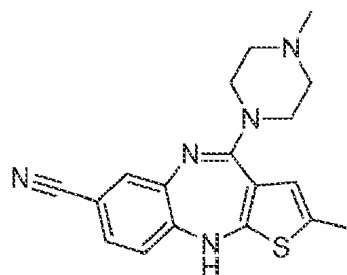
Paso C

2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azuleno-7-carbonitrilo

45

50

55

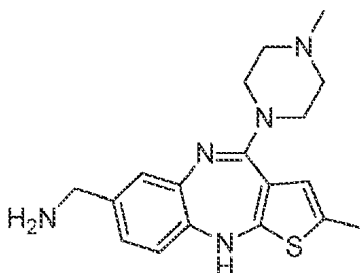


A una solución de clorhidrato de 10-amino-2-metil-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azuleno-7-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (0,6 g) en DMSO (6 ml) y tolueno (6 ml), se añadió 1-metilpiperazina (4 ml). La mezcla se calentó en un baño de aceite a 130° C durante 17 horas. La solución se concentró, se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó con agua (20 ml) y salmuera (20 ml) y luego se concentró. El sólido se disolvió en diclorometano (10 ml) y se trató con una solución saturada de bicarbonato de sodio. El compuesto del título se recogió como un precipitado amarillo claro, se lavó con agua y diclorometano, se secó y se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. LC-MS: m/z 338 (M+1). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz): δ (ppm) 7.19-7.15 (m, 2H), 6.74 (d, 1H), 6.37 (s, 1H), 3.51 (m, 4H), 2.53 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

60

65 Paso D

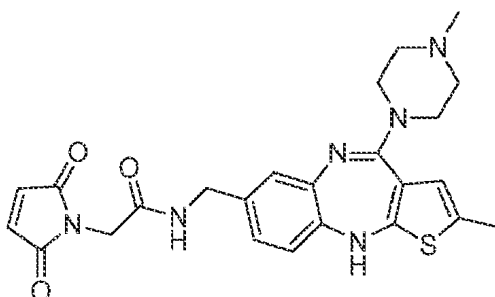
(2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metanamina



A una solución de 2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azuleno-7-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (0,25 g) en metanol (90 ml) se añadió HCl concentrado (0,4 ml) y Pd negro (57 mg). La hidrogenación se llevó a cabo a 50 psi durante 1 h. Se añadió más Pd negro (147 mg). La mezcla se agitó a 50 psi durante 22 h. El catalizador se filtró y se lavó con metanol. El filtrado se concentró, se trató con una solución de bicarbonato de sodio saturado (5 ml) y se concentró hasta la sequedad. El producto se purificó por columna de sílice. LC-MS: m/z 342 (M+1). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz): δ (ppm) 6.89-6.85 (m, 2H), 6.64 (d, 1H), 6.34 (d, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.46 (m, 4H), 2.54 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.30 (d, 3H).

#### Ejemplo 4

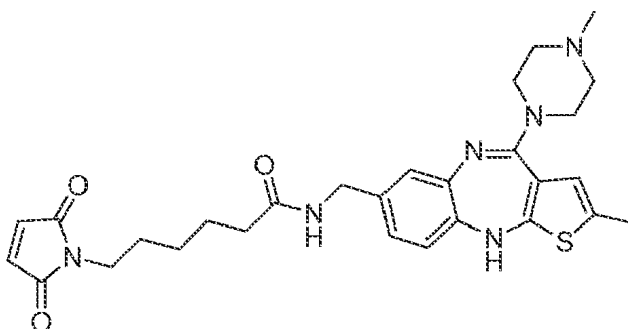
2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metil)acetamida



A una solución de (2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metanamina, preparada como se describe en el Ejemplo 3, (3,5 mg, 10,2 μmoles) en 185 μl de DMF y 4,5 μl de tributilamina se añadieron 260 μl de una solución de DMF de éster de N-(α-maleimidoacetoxi) succinimida (AMAS, 10 mg/ml, 2,6 mg, 10,2 μmoles). La solución resultante se dejó agitar durante 90 minutos a 20° C, luego se usó como tal en la reacción de conjugación con proteína activada con tiol.

#### Ejemplo 5

6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metil)hexanamida



A una solución de (2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metanamina, preparada como se describe en el Ejemplo 3, (59 mg, 0,17 mmol) en diclorometano (4 ml) se le añadió trietilamina

(0,048 ml, 0,34 mmol) y éster de N-hidroxisuccinimida 6-maleimidohexanoico (53 mg, 0,17 mmol) en diclorometano (1 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, luego se cargó en una columna de sílice, se eluyó con metanol /diclorometano al 3-5% que contenía trietilamina. El compuesto del título se obtuvo como un sólido amarillo. LC-MS: m/z 535 (M+1).

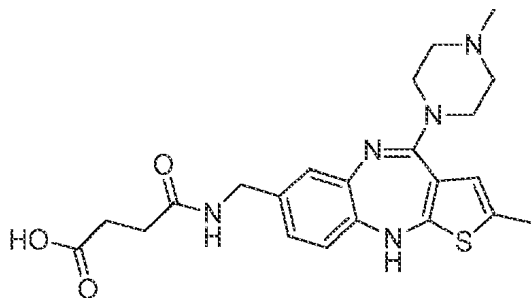
5

Ejemplo 6

Ácido N-[2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azulen-7-ilmetil]-succinámico

10

15



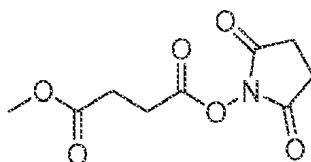
20

Paso A

Éster metílico del éster de 2,5-dioxo-pirrolidina-1-ilo de ácido succínico

25

30



A una solución de 1-hidroxi-pirrolidina-2,5-diona (1,23 ml, 10 mmol) en acetato de etilo (50 ml) se le añadió éster metílico de ácido 3-clorocarbonil-propiónico (1,15 g, 10 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo. Se añadió trietilamina (1,4 ml, 10 mmol) gota a gota. La suspensión resultante se agitó durante 10 min en un baño de hielo y durante 5 min sin baño de hielo. El sólido blanco se eliminó por filtración y se lavó con acetato de etilo (3 x 3 ml). El filtrado se concentró hasta un sólido blanco (2,32 g).

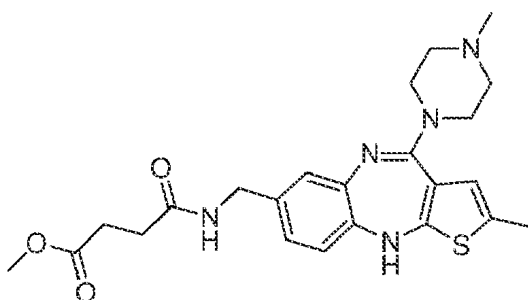
35

Paso B

Éster metílico de ácido N-[2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azulen-7-ilmetil]-succinámico

45

50



A una solución de (2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metanamina, preparada como se describe en el Ejemplo 3, (40 mg, 0,12 mmol) en diclorometano (2 ml) se le añadió trietilamina (0,030 ml, 0,22 mmol) y éster metílico de éster de 2,5-dioxo-pirrolidina-1-ilo de ácido succínico, preparado como se describe en el paso anterior, (31 mg, 0,13 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se concentró. El bruto se cargó en una columna de sílice, se eluyó con metanol/diclorometano al 3-5% que contenía hidróxido de amonio para dar el compuesto del título en forma de un sólido amarillo. LC-MS: m/z 456 (M+1).

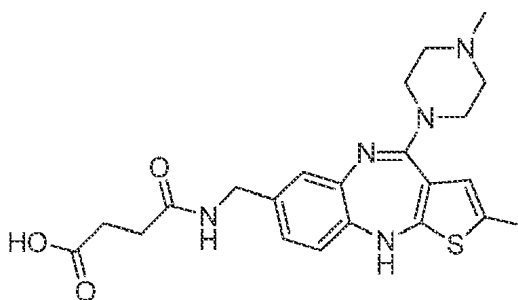
60

Paso C

Ácido N-[2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azulen-7-ilmetil]-succinámico

65





A una suspensión de éster metílico de ácido N-[2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azulen-7-ilmetil]-succinámico, preparado como se describe en el paso anterior, (80 mg, 0,18 mmol) en THF (1,5 ml) se añadió LiOH (14 mg) en agua (0.5 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, se acidificó con HCl diluido y se concentró hasta la sequedad. LC-MS: m/z 442 (M+1 del original).

#### Ejemplo 7

Conjugado de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3]-e)[1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metil)acetamida - hemocianina de lapa californiana

#### Paso A

A una solución de 3,19 ml de hemocianina de lapa californiana (KLH, 15,2 mg, 0,152  $\mu$ moles) en tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46M, a pH 7,4 se añadieron 70,3  $\mu$ l de una solución DMF de N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA, 25 mg/ml, 1,75 mg, 7,60  $\mu$ moles). La solución resultante se incubó a 20° C durante 1 hora en un mezclador de rodillos. A la reacción se añadieron 319  $\mu$ l de hidroxilamina 2,5M, EDTA 50 mM, pH 7,0 y la solución resultante se incubó a 20° C durante 25 minutos, en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, EDTA 5 mM, a pH 6,0.

#### Paso B

Al KLH-SH, preparado como se describe en el paso anterior, (4,29 ml, 12,7 mg 0,127  $\mu$ moles) se añadió una alícuota de la solución preparada en el Ejemplo 2, (566,6  $\mu$ l, 12,7  $\mu$ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 2 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 20  $\mu$ m y luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando un tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, a pH 7,4.

#### Ejemplo 8

Conjugado de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3]-e)[1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metil)acetamida-tiroglobulina bovina

#### Paso A

A 2,0 ml de una solución de tiroglobulina bovina (BTG, 20,0 mg, 0,03  $\mu$ moles) en tampón de fosfato 100 mM pH 7,5 se añadieron 276,0  $\mu$ l de una solución DMF de N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA, 25 mg/ml, 6,9 mg, 30,0  $\mu$ moles). La solución resultante se incubó a 20° C durante 1 hora en un mezclador de rodillos. A la reacción se añadieron 230  $\mu$ l de hidroxilamina 2,5 M, EDTA 50 mM, pH 7.0. La solución resultante se incubó a 20° C durante 15 minutos en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, EDTA 5 mM, a pH 6,0.

#### Paso B

Al BTG-SH, preparado como se describe en el paso anterior, (4,73 ml, 14,3 mg, 0,022  $\mu$ moles) se añadió una alícuota de la solución preparada en el Ejemplo 2, (969,6  $\mu$ l, 21,7  $\mu$ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,45  $\mu$ m, luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

#### Ejemplo 9

Conjugado de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3]-e)[1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metil)acetamida-ovalbúmina

## Paso A

A 1,2 ml de una solución de ovoalbúmina (12,0 mg, 0,27  $\mu$ moles) en tampón de fosfato 100 mM, pH 7,5, se añadieron 50,1  $\mu$ l de una solución DMF de N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA, 25 mg/ml, 1,25 mg, 5,42  $\mu$ moles). La solución resultante se incubó a 20° C durante 1 hora en un mezclador de rodillos. A la reacción se añadieron 120  $\mu$ l de hidroxilamina 2,5M, EDTA 50 mM, a pH 7.0. La solución resultante se incubó a 20° C durante 15 minutos en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, EDTA 5 mM, a pH 6,0.

## 10 Paso B

A la ovoalbúmina-SH, preparada como se describe en el paso anterior, (4,2 ml, 8,0 mg, 0,18  $\mu$ moles) se añadió una alícuota de la solución preparada en el Ejemplo 2, (200  $\mu$ l, 4,5  $\mu$ moles). La mezcla resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

## Ejemplo 10

20 Conjugado de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metil)acetamida - hemocianina de lapa californiana

25 Al KLH-SH, preparado como se describe en el Paso A del Ejemplo 7, (3,31 ml, 9,8 mg, 0,098  $\mu$ moles) se añadió una alícuota de 300  $\mu$ l de solución de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metil)acetamida, preparada como se describe en el Ejemplo 4, (6,9  $\mu$ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 2,5 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,2  $\mu$ m y luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, a pH 7,4.

## 30 Ejemplo 11

Conjugado de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metil)acetamida-ovalbúmina

35 A la ovoalbúmina-SH, preparada como se describe en el Paso A del Ejemplo 9 (5,38 ml, 17,8 mg, 0,40  $\mu$ moles), se añadió una alícuota de 200  $\mu$ l de solución de 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metil)acetamida, preparada como se describe en el Ejemplo 4, (10,2  $\mu$ moles). La mezcla resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,45  $\mu$ m y luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

## 40 Ejemplo 12

45 Conjugado de Ácido N-[2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azulen-7-ilmetil]-succinámico-tiroglobulina bovina

## Paso A

50 Una solución de ácido N-[2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azulen-7-ilmetil]succinámico, preparada como se describe en el Ejemplo 6, (7,9 mg, 18,0  $\mu$ moles), N-hidroxisuccinimida (NHS, 8,3 mg, 72,0  $\mu$ moles) y N,N-diciclohexilcarbodiimida (14,9 mg, 72,0  $\mu$ moles) en 500  $\mu$ l de DMF y 5  $\mu$ l de tributilamina se dejó agitar durante 18 horas a 20° C, luego se usó como tal en conjugación con proteína.

## Paso B

55 A 2,98 ml de una solución de tiroglobulina bovina (BTG, 14,9 mg, 0,023  $\mu$ moles) en tampón de fosfato 100 mM, pH 7,5, se añadieron 500  $\mu$ l de la solución preparada en el Paso A (18,0  $\mu$ moles). La mezcla turbia resultante se incubó a 20° C durante 2,5 horas en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,45  $\mu$ m y luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

## 60 Ejemplo 13

Inmunoensayo competitivo para olanzapina

65 Después de una serie de inmunizaciones con inmunógenos de olanzapina, se analizó la reactividad de las

hemorragias en colas del ratón usando un ELISA. También se analizaron los sobrenadantes de hibridoma, y los datos de ELISA que se muestran en las Tablas 1 y 2 a continuación muestran la reactividad de varios hibridomas (el compañero de fusión fue células NSO).

5 Tabla 1

		Placa 2												
Dilución		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
10	1/400													Ag =Bt-Compuesto 11
	1/1200	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
	1/3600													
15	1/400													Ag =Bt-Compuesto 11
	1/1200	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
	1/3600													
20	1/400	0.0136	0.0432	0.131	0.0654	0.4092	0.039	0.016	0.1406	0.0712	1.4354	2.0086	0.0861	Ag =Bt-Compuesto 11
	1/1200	0.0113	0.0194	0.0477	0.0291	0.1293	0.031	0.012	0.0374	0.0126	0.4411	0.8874	0.0362	
	1/3600	0.0092	0.0110	0.0233	0.0153	0.0462	0.013	0.009	0.0314	0.0275	0.2073	0.3555	0.0217	
25	1/400	0.0105	0.0111	0.0159	0.0107	0.0224	0.012	0.009	0.0172	0.0168	0.0972	0.147	0.0141	Ag =Bt-Compuesto 11
	1/1200	0.0333	0.1612	1.1412	1.0762	0.3042	0.04	0.449	0.1619	1.8038	0.8933	0.7666	1.258	
	1/3600	0.0144	0.055	0.4575	0.3223	0.0907	0.016	0.144	0.0402	0.1536	0.0288	0.2956	0.4374	
	1/10800	0.008	0.0333	0.2636	0.1977	0.0361	0.011	0.051	0.0206	0.708	0.0155	0.1212	0.2072	
	1/10800	0.0109	0.0181	0.0885	0.0581	0.027	0.01	0.045	0.0217	0.5338	0.0132	0.0585	0.0854	

30 Tabla 2

		Placa 3											
Dilución		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
35	100												
	300												
	300	6B2	3C4	2B3	2C6	3A2	1E8	3F11	4C9	6D11	6C2	6I2	Vacia
	900												
	2700												
	2700												
40	100	0.9628	0.5634	2.9988	1.9883	0.7869	2.7554	2.298	1.027	0.1174	0.0223	0.541	0
	300	0.9527	0.429	2.7862	1.3797	0.6534	2.3972	2.0249	0.934	0.1115	0.7632	0.0386	0.0957
	900	0.0202	0.1462	1.3765	0.6961	0.2337	1.3963	0.8862	0.2993	0.0376	0.2486	0.0177	0.0031
	300	0.0208	0.1108	1.3186	0.6235	0.2173	1.1112	0.6114	0.3115	0.0486	0.2183	0.0171	0.0052
	900	0.0132	0.0242	0.4225	0.1987	0.0849	0.4472	0.2988	0.0895	0.0179	0.0851	0.012	0.0039
	900	0.0146	0.0554	0.4551	0.1731	0.0839	0.4471	0.3499	0.0951	0.016	0.0863	0.0128	0.0055
45	2700	0.0109	0.0359	0.1877	0.0713	0.0334	0.1709	0.1381	0.0352	0.0111	0.036	0.0054	0.0041
	2700	0.0122	0.028	0.1835	0.0903	0.0404	0.1924	0.1662	0.0408	0.0113	0.0325	0.0094	0.005

El sobrenadante se analizó mediante ELISA de competición para determinar si las señales eran específicas para la olanzapina. Las Figs. 1-3 muestran los resultados de tres hibridomas representativos resultantes de la fusión de ratón 11.1. Los datos muestran reactividad específica para la olanzapina con reactividad variada para la clozapina.

La Fig. 4 muestra el formato de inmunoensayo competitivo utilizado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral en el que el anticuerpo de captura, un clon de olanzapina, se depositó en un chip junto con un conjugado de detección que consiste de olanzapina conjugada con un fluoróforo. En este formato competitivo como se muestra en la Fig. 4, un nivel bajo de analito (olanzapina) da como resultado una señal alta, mientras que un nivel alto de analito (olanzapina) da como resultado una señal baja. La cantidad de olanzapina en la muestra puede calcularse a partir de la pérdida de fluorescencia en comparación con una muestra de control sin fármaco presente. Una curva de respuesta a la dosis típica generada con el clon 35 de olanzapina se muestra en la Fig. 5, con el clon 61 de olanzapina mostrado en la Fig. 6, y con el clon 3F11 de olanzapina mostrado en la Fig. 7.

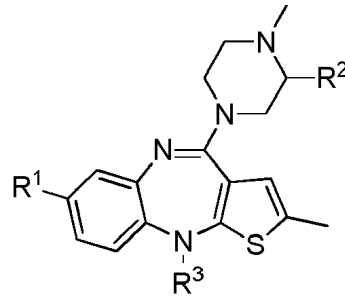
REIVINDICACIONES

1. El compuesto de Fórmula I:

5

10

15



Fórmula I

20

en el que:

R<sup>1</sup> es H,

25

30

35

40

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>2</sup> es H,

45

50

55

60

65

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H; con la condición de que o R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> debe ser H, y además con la condición de que tanto R<sup>1</sup> como R<sup>2</sup> pueden no ser H simultáneamente;  
R<sup>3</sup> es H;  
m es 1, 2, 3, 4 o 5;

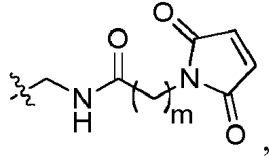
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

2. El compuesto de la reivindicación 1,  
en el que:

5

R<sup>1</sup> es H,

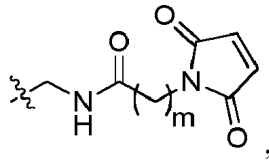
10



15

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H;  
R<sup>2</sup> es H,

20



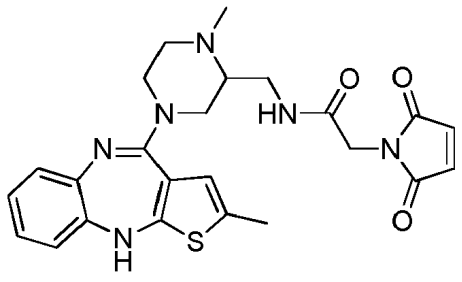
25

CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, o CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H; con la condición de que o R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> debe ser H, y además con la  
condición de que tanto R<sup>1</sup> como R<sup>2</sup> pueden no ser H simultáneamente;  
R<sup>3</sup> es H;  
m es 1, 2, 3, 4 o 5;  
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

30

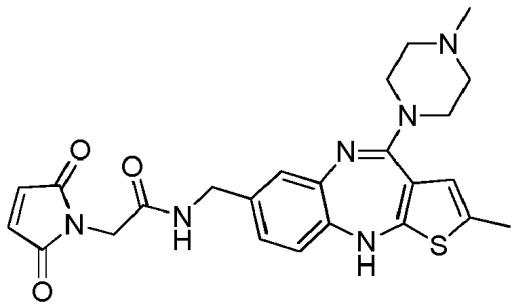
3. El compuesto de la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste de:

35



40

45



50

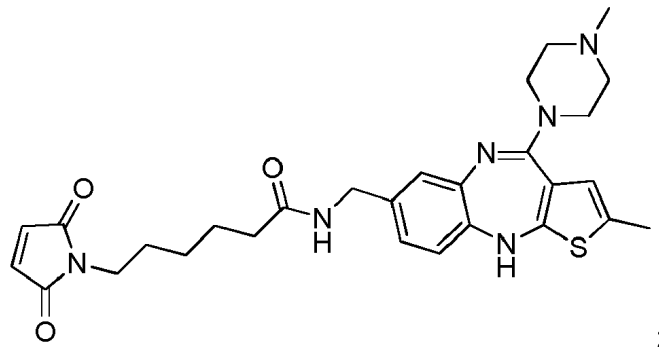
55

60

65

5

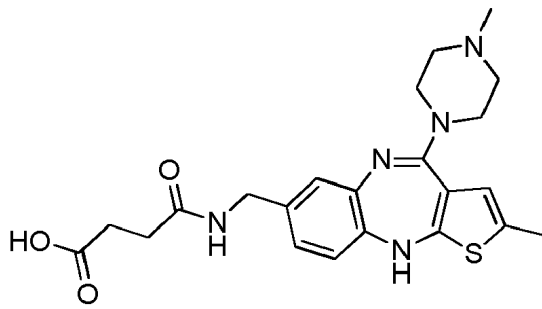
10



;

15

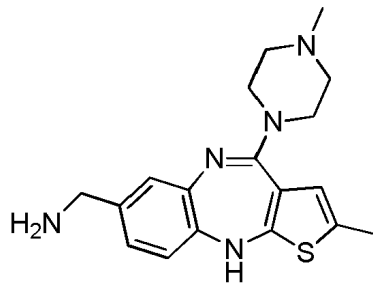
20



;

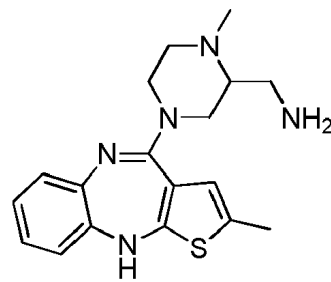
30

35



40 y

45

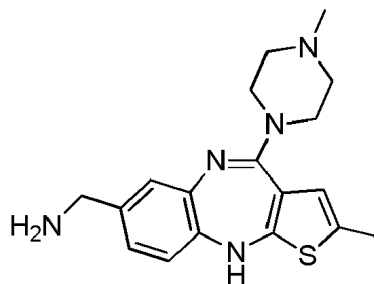


50

4. El compuesto de la reivindicación 3, que es:

55

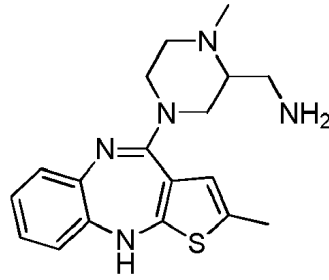
60



65

5. El compuesto de la reivindicación 3, que es:

5



10

6. Un conjugado del compuesto de la Reivindicación 1 y un portador inmunogénico.

15

7. El conjugado de la Reivindicación 6, en el que el portador inmunogénico es una proteína.

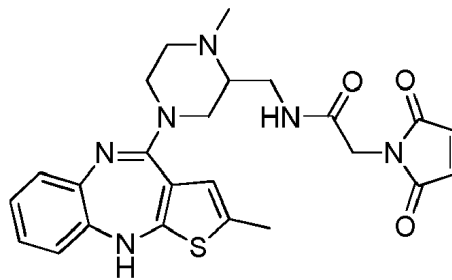
8. El conjugado de la reivindicación 7, en el que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovoalbúmina.

20

9. Un conjugado del compuesto de la Reivindicación 2 y un portador inmunogénico.

10. El conjugado de la Reivindicación 6, en el que el compuesto es:

25

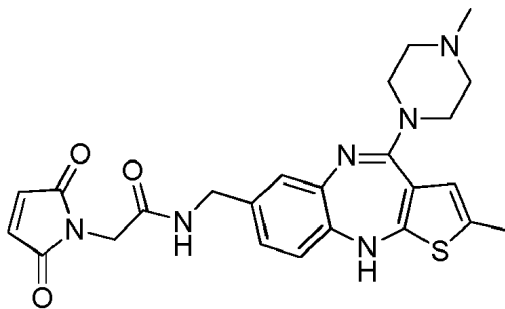


30

35

11. El conjugado de la Reivindicación 6, en el que el compuesto es:

40

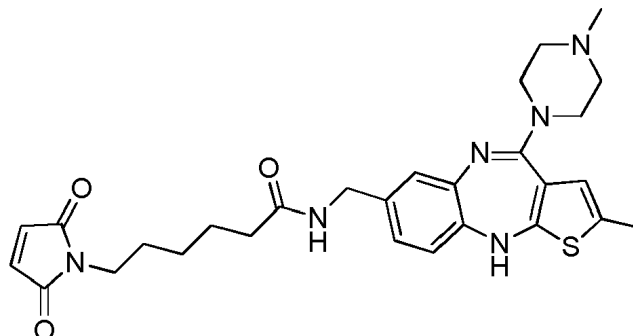


45

50

12. El conjugado de la Reivindicación 6, en el que el compuesto es:

55



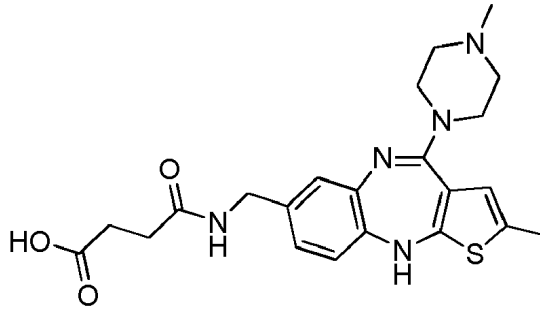
60

65

13. El conjugado de la Reivindicación 6, en el que el compuesto es:

5

10



15

14. Un proceso para elaborar el conjugado de la Reivindicación 6, el proceso comprendiendo poner en contacto un compuesto como se define en la Reivindicación 1 con un portador inmunogénico.

20

15. El proceso de la Reivindicación 14, en el que el portador inmunogénico es una proteína.

16. El proceso de la Reivindicación 15, en el que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovoalbúmina.

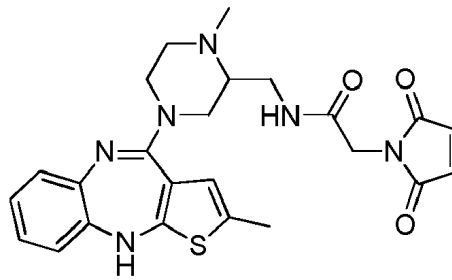
25

17. Un proceso para elaborar el conjugado de la Reivindicación 9, el proceso comprendiendo poner en contacto un compuesto de la Reivindicación 2 con un portador inmunogénico.

18. El proceso de cualquiera de las Reivindicaciones 14-16, en el que el compuesto es:

30

35

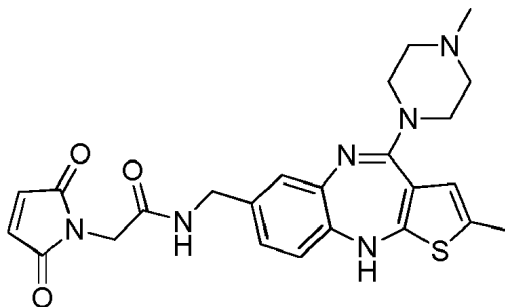


40

19. El proceso de cualquiera de las Reivindicaciones 14-16, en el que el compuesto es:

45

50



55

20. El proceso de cualquiera de las Reivindicaciones 14-16, en el que el compuesto es:

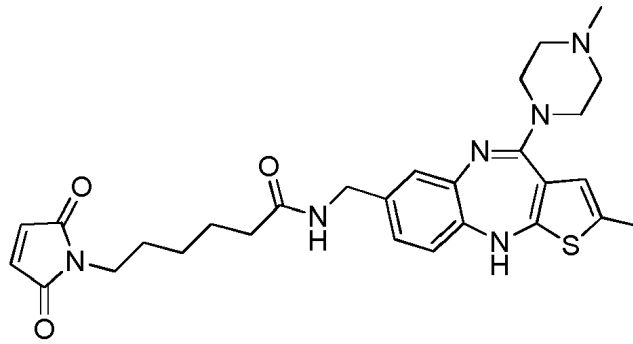
60

65



5

10

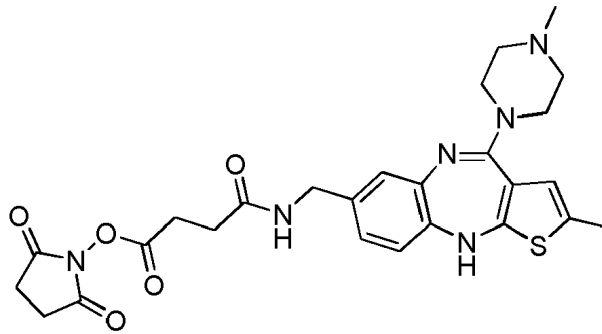


15

21. El proceso de cualquiera de las Reivindicaciones 14-16, en el que el compuesto es:

20

25



30

35

40

45

50

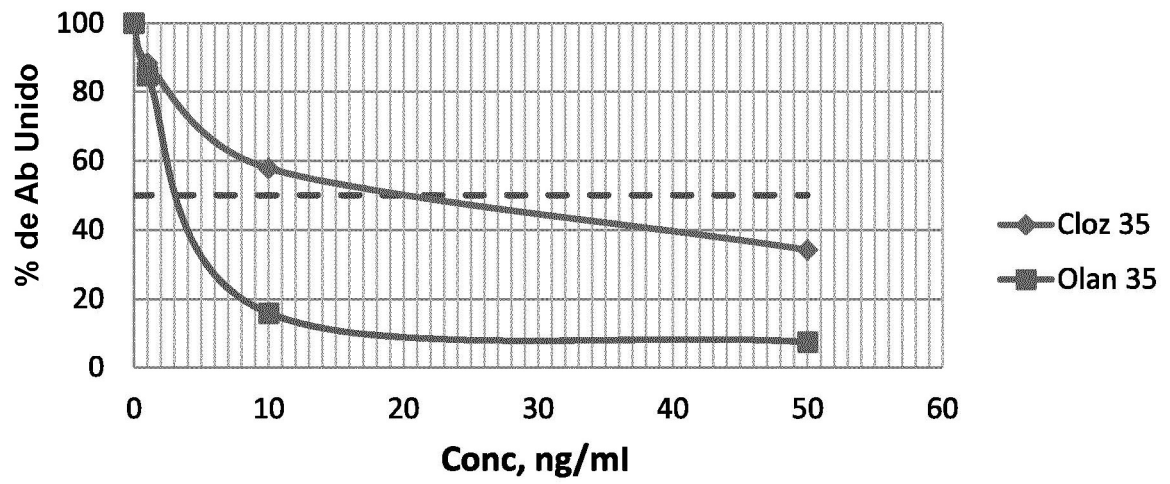
55

60

65

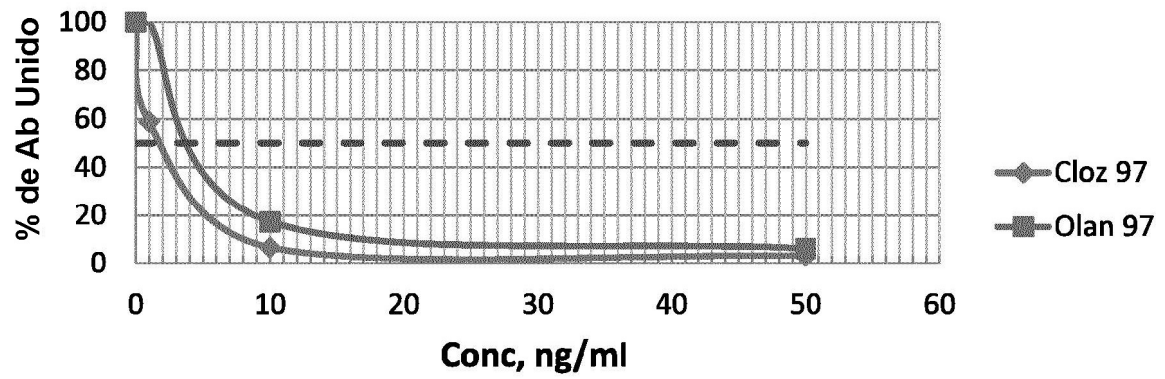
**Fig. 1**

**Competición Cloz/Olan  
ratón 11.1**

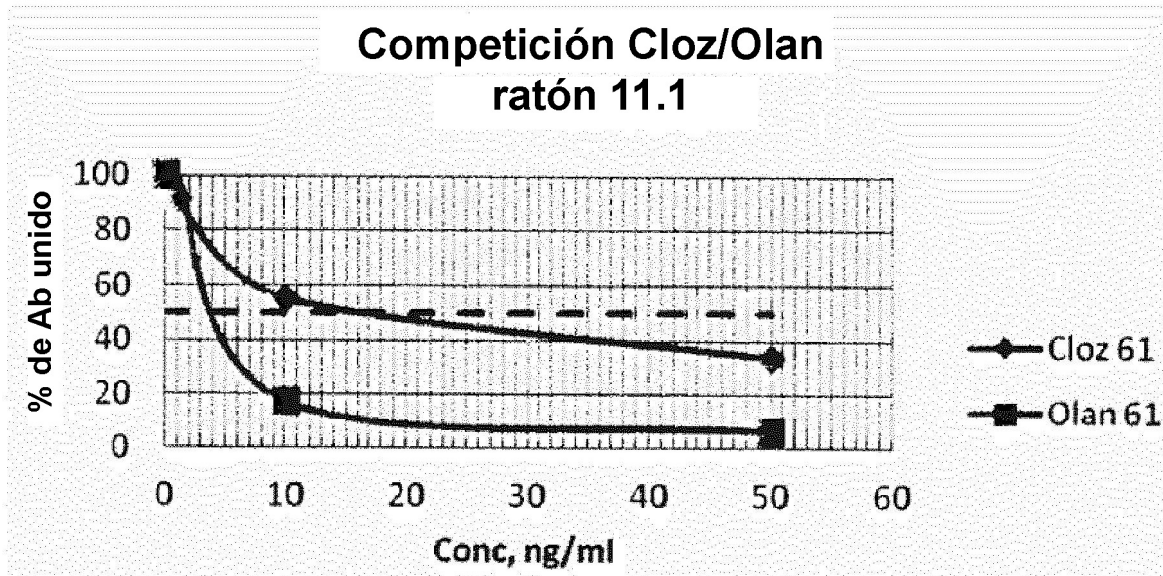


**Fig. 2**

**Competición Cloz/Olan  
ratón 11.1**

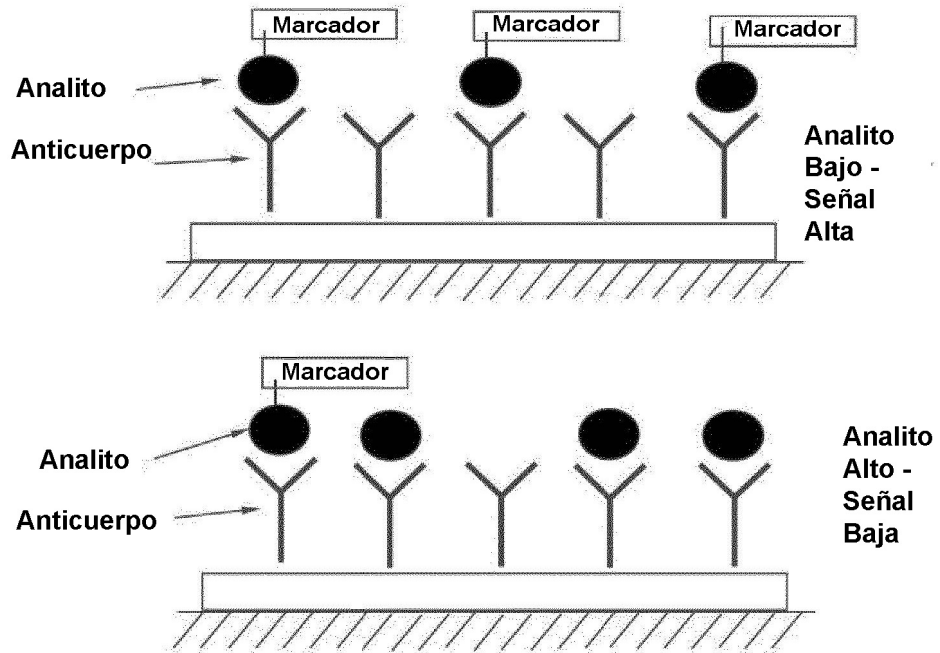


**Fig. 3**



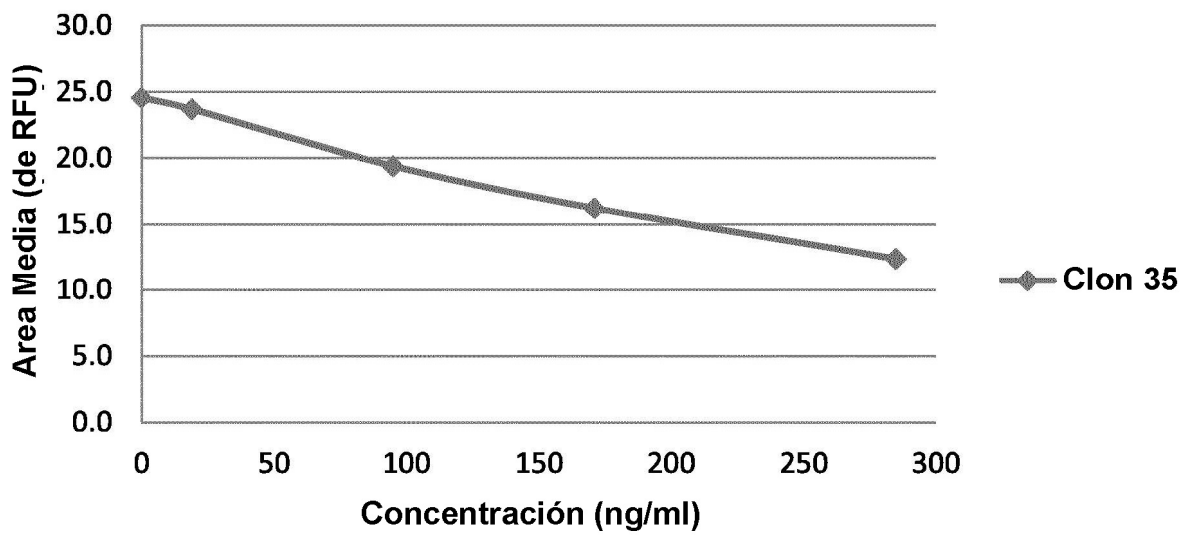
**Fig. 4**

**Formatos Competitivos: AB Abajo**



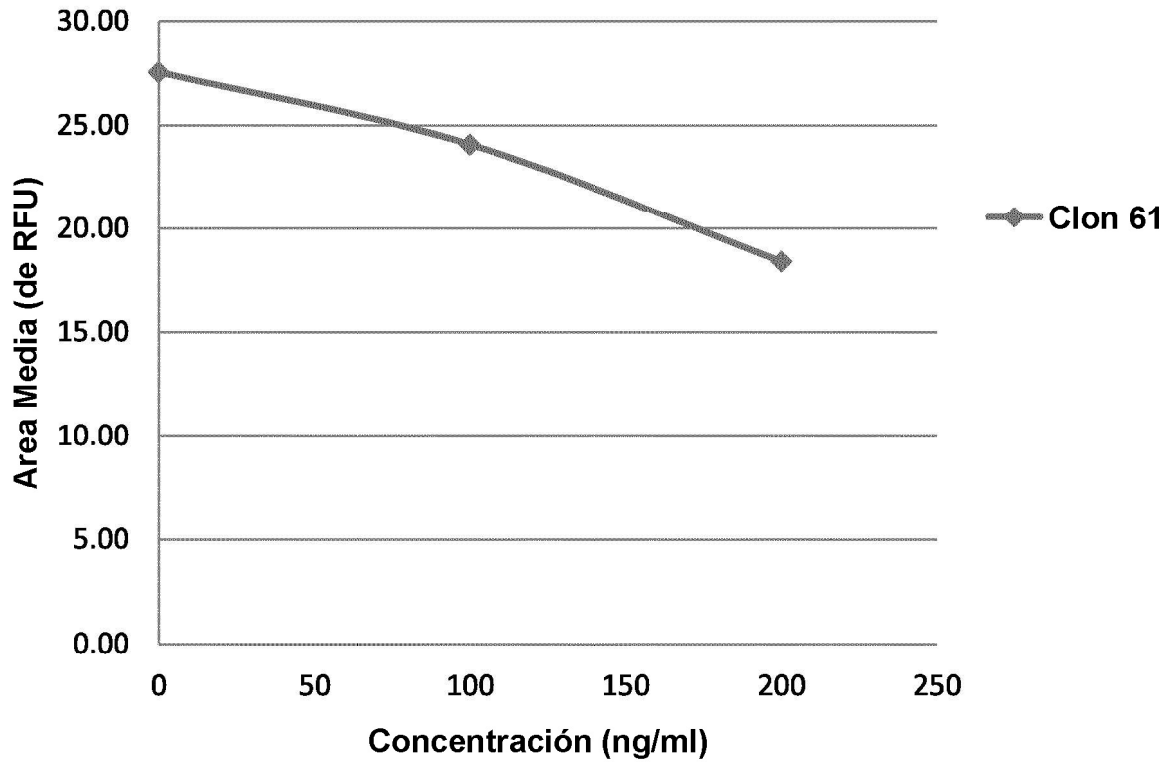
**Fig. 5**

**Pruebas con Clon 35 de Ab de Olanzapina  
Area de Pico Media frente a Concentración de Olanzapina**



**Fig. 6**

**Pruebas con Clon 35 de Ab de Olanzapina  
Area de Pico Media frente a Concentración de Olanzapina**



**Fig. 7**

**Evaluación de Anticuerpo de Olanzapina  
Area de Pico Media frente a Concentración de  
Olanzapina**

