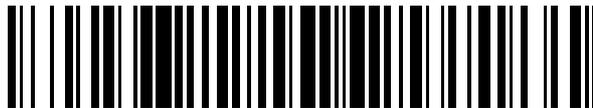


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 774**

21 Número de solicitud: 201631133

51 Int. Cl.:

**C07D 503/14** (2006.01)

**A61K 31/424** (2006.01)

**C07C 53/122** (2006.01)

**C07C 53/124** (2006.01)

**A61K 31/185** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**29.08.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**16.08.2019**

Fecha de concesión:

**19.05.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**26.05.2020**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2017/070588**

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (60.0%)  
Avda. de la Constitucion, 18  
41071 Sevilla (Sevilla) ES y  
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (40.0%)**

72 Inventor/es:

**MONTAÑEZ VEGA, María Isabel;  
MAYORGA MAYORGA, Cristobalina;  
TORRES JAÉN, María José;  
FERNÁNDEZ DUARTE, Tahía Diana;  
ARIZA VEGUILLAS, Adriana;  
SALAS CASINELLO, María;  
PÉREZ INESTROSA, Ezequiel;  
NÁJERA ALBENDÍN, Francisco;  
BARBERO OLMOS, Nekane y  
VIDA POL, Yolanda**

74 Agente/Representante:

**FUSTER, Gustavo**

54 Título: **Composición útil en la detección de alergia a ácido clavulánico**

57 Resumen:

Compuestos útiles en la detección de alergia a ácido clavulánico.

Los autores de la presente invención han descrito unos compuestos derivados o estructuras relacionadas con el ácido clavulánico y sus usos médicos. Por otro lado, la invención también se refiere a una composición, a una forma farmacéutica, a un kit o dispositivo y sus usos.

ES 2 722 774 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

## DESCRIPCIÓN

**Composición útil en la detección de alergia a ácido clavulánico****CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, la farmacia y la química biológica, y se refiere, fundamentalmente, a una composición de derivados del ácido clavulánico en una concentración determinada, a su identificación, al cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico (CLV) y a un kit o dispositivo de diagnóstico que comprende dicha composición.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Los antibióticos betalactámicos (BL) son la causa más frecuente de alergia a fármacos, estando un 10% de la población general “etiquetada” como alérgica a los mismos (Doña *et al.*, 2014. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 24:143-153). Esto tiene enormes implicaciones ya que los facultativos se enfrentan a la decisión de elegir un tratamiento antibiótico alternativo, que aunque no es el de primera elección, es más caro y con más efectos secundarios (Macy *et al.*, 2014. *Allergy Clin. Immunol.* 133:790-796). En la actualidad el desarrollo de nuevos antibióticos no es una prioridad para la industria farmacéutica y puesto que las tasas de resistencias bacterianas están en continuo aumento, la alergia a BL se ha convertido en un problema de salud global (Solensky *et al.*, 2014. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133:797-798). Sin embargo, menos del 20% de los adultos y del 10% de los niños considerados alérgicos realmente lo son, por ello un correcto diagnóstico es clave para la seguridad del paciente y sostenibilidad del sistema sanitario (Doña *et al.*, 2014. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 24:143-153; Zambonino *et al.*, 2014. *Pediatr Allergy Immunol.* 25:80-87).

Todos los BL pueden inducir reacciones alérgicas, siendo las mediadas por IgE las más frecuentes, graves y mejor estudiadas, constituyendo el objeto de estudio de este proyecto. La bencilpenicilina (BP) fue el primer BL implicado aunque desde finales de los 80 fue desplazada por la amoxicilina (AX) que es actualmente el BL más relevante (Torres *et al.*, 2010. *Allergy* 56:850-856). Así, de 1999 a 2009 ha tenido lugar un aumento relativo de la frecuencia de pruebas cutáneas positivas a AX del 79% con disminución de las de BP en un 38%. Sin embargo, este escenario continua cambiando en todo el mundo, ya que la combinación de dos BL, amoxicilina-ácido clavulánico (AX-CLV), es la más frecuentemente implicada en las reacciones, siendo del 10 al 35% entre 2008-2010 (Dona *et al.*, 2012. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 22:363-371), y aproximándose al 60% en 2014. Esta tendencia se confirma en pacientes con sospecha de reacción alérgica atendidos en

urgencias de tres hospitales de tercer nivel en 2014, ya que la combinación AX-CLV es la responsable en el 87,1% de los casos confirmados como alérgicos a BL (Barrionuevo *et al.*, EAACI Meeting, 2015). Estos datos reflejan cambios en los patrones de consumo, con descenso en el uso de AX (57-35,9%) y aumento de AX-CLV (39-61,8%) en España en el periodo 1997-2009 (Lázaro *et al.*, 2010. División de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia (AEMPS)). Estos hechos requieren que se re-evalúe en detalle la situación actual de la alergia a BL.

En base a modelos experimentales, durante años se consideró que el CLV carecía de capacidad inmunogénica (Edwards *et al.*, 1988. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 85:184-189). Sin embargo, en 2010 publicamos la primera serie de 77 pacientes con reacciones a AX-CLV, identificando al CLV como responsable en el 30% de los casos, sobrepasando de forma manifiesta a la BP (6%); Torres *et al.*, 2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:502-505 e502).

Estos resultados han sido confirmados por otros grupos, lo que indica que en la actualidad las reacciones a CLV están cercanas al 40% (Sanchez-Morillas *et al.*, 2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126:177-179; Blanca-Lopez *et al.*, 2010. *Allergy* 70:1013-1019). Además, la alergia a CLV no se modifica a pesar de la administración repetida de AX, ya que no induce reactividad cruzada debido a sus diferencias estructurales (Blanca-Lopez *et al.*, 2010. *Allergy* 70:1013-1019). Esto es importante ya que el alérgico a CLV tras la administración de AX-CLV, puede utilizar con seguridad cualquier otro antibiótico BL, incluido AX, ampliando el arsenal terapéutico, lo que no ocurre en los alérgicos a AX (Torres *et al.*, 2016. *Clin. . Exp. Allergy* 46:264-274). Por todo ello, es muy importante el diagnóstico preciso de estos pacientes.

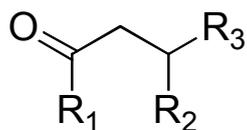
En los últimos años hemos trabajado en el diseño de herramientas diagnósticas de alergia a CLV, y su incorporación a guías de práctica clínica. Entre los avances se incluye la patente (P20093078) del reactivo (ácido clavulánico, CLV) para pruebas cutáneas en explotación por laboratorios Diater, el test de activación de basófilos o TAB (Torres *et al.*, 2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:502-505 e502) y el test de liberación de histamina (TLH; Pineda *et al.*, 2015. *Intern. Arch. Allergy Immunol.* 168:233-240), este último en colaboración con laboratorios Diater. Sin embargo, hasta en un 25% de los pacientes alérgicos a AX-CLV, no se puede confirmar el diagnóstico, ya que la sensibilidad de las pruebas cutáneas e *in vitro* no son óptimas. Esto implica que un alto porcentaje de pacientes con anafilaxia va a requerir para su diagnóstico la prueba de re-administración controlada (RAC), lo que supone un incremento del gasto y riesgo para el paciente.

La compleja reactividad química del CLV (Baggaley *et al.*, 1997. *Nat. Prod. Rep.* 14:309-333; Martin *et al.*, 1989. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2* 223-226; Brethauer *et al.*, 2008. *J. Pharm. Sci.* 97:3451-3455; Tremblay *et al.*, 2008. *Biochemistry* 47:5312-5316) ha dificultado la identificación de sus determinantes antigénicos. Tras su conjugación a proteínas, la estructura química resultante no es estable, por lo que se conoce muy poco sobre su inmunogenicidad (Torres *et al.*, 2016. *Clin. . Exp. Allergy* 46:264-274). Se asume que para desarrollar una respuesta alérgica a CLV, se requiere un ataque nucleófilo por parte de la proteína al carbonilo betalactámico del CLV, generándose conjugados CLV-proteínas. Sin embargo, la inestabilidad de la estructura resultante tras la conjugación conduce a rutas de degradación complejas dando lugar a múltiples posibles determinantes, lo que dificulta la identificación de las moléculas que conforman el determinante antigénico (Ariza *et al.*, 2015. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 25:12-25). Solo un estudio, publicado en 1988, ha descrito la inmunogenicidad intrínseca del CLV, en la que se hipotetiza la formación de un determinante de bajo peso molecular (tipo oxopropanamida) junto con otros productos de degradación (Edwards *et al.*, 1988. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 85:184-189). Otras publicaciones más recientes, fuera del contexto de alergia, han descrito la unión del CLV a beta-lactamasas (Tremblay *et al.*, 2008. *Biochemistry* 47:5312-5316; Rodkey *et al.*, 2013. *J. Am. Chem. Soc.* 135:18358-18369) con mecanismos de conjugación y estructuras propuestas de acuerdo a las previamente descritas. Aunque son escasos, los datos disponibles apuntan a la formación de aductos con baja densidad de determinantes pequeños y heterogéneos, dificultando su capacidad inmunogénica (Lee *et al.*, 1985. *J. Immunol. Methods* 84:235-243; Park *et al.*, 1987. *Biochem. Pharmacol.* 36:581-590). No obstante son necesarios más estudios para conocer la estructura responsable de las reacciones de hipersensibilidad inmediata a CLV y, por tanto, poder mejorar los tests diagnósticos.

Hemos realizado diferentes aproximaciones sintéticas de potenciales determinantes del CLV, correspondientes a diferentes fragmentaciones del fármaco tras su unión a proteínas, para su evaluación inmunológica en tests *in vitro*.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a compuestos estructuralmente relacionados o derivados del ácido clavulánico, de fórmula general (I) o Clav, de ahora en adelante compuestos de la invención:



Fórmula (I) o Clav

donde

5 R1 son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluro, anhídridos, carbonato o éster.

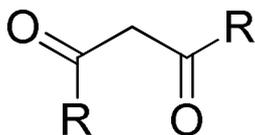
R2 es un grupo que se selecciona de entre aldehído, alcoxi, o amino.

R3 es un grupo que se selecciona de entre hidrogeno, alcoxi, o grupos activantes de ácido como los haluros, anhídridos o carbonatos.

10 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los compuestos de la invención se seleccionan de la lista que consiste en:

a) Clav 2, de fórmula (II):



15

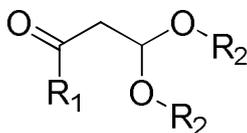
Fórmula (II)

donde

R son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluro, anhídrido o carbonato.

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones,

20 b) Clav 5, de fórmula (III):



Fórmula (III)

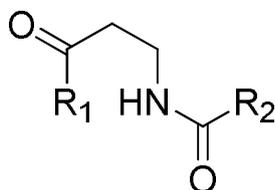
donde

R1 son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluro, anhídrido o carbonato.

5 R2 es un grupo alquilo.

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones,

c) Clav 6, de fórmula (IV):



10

Fórmula (IV)

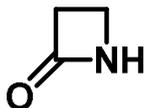
donde

R1 son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluro, anhídrido o carbonato.

R2 es un grupo alquilo.

15 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, y/o

d) Clav 7, de fórmula (V) (2-azetidinona):

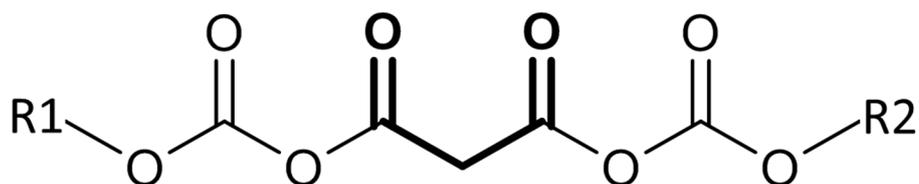


Fórmula (V)

20

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 2 tiene fórmula (IIa):

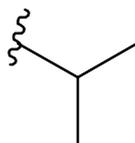


Fórmula (IIa)

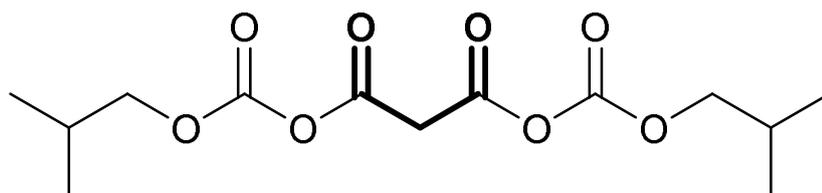
5 Donde R1 y R2 corresponden a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de Carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), tal y como de 1 átomo de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, de 5 átomos de carbono y/o de 6 átomos de carbono, substituidos o no, ramificados o no, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), más preferiblemente de 4 átomos de carbono (C<sub>4</sub>), substituidos o no, ramificados o no, preferiblemente no substituidos y ramificados.

10 R1 y R2 pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, R1 y R2 son iguales.

Preferiblemente, R1 y R2 son grupos alquilo de cuatro átomos de carbono, no substituidos y ramificados, tal y como:



15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 2 es el anhídrido bis-((isobutoxicarbonil)oxi)-1,3-dioxopropanoico, con fórmula (VI):

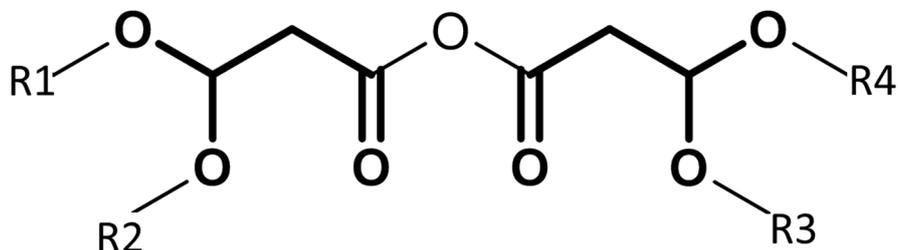


20

Fórmula (VI)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 5 tiene fórmula (IIIa):



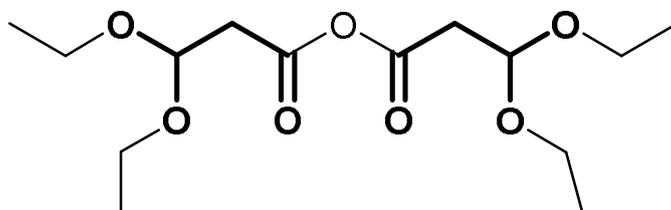
Fórmula (IIIa)

5 Donde R1, R2, R3 y R4, si están presentes, corresponden a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), substituidos o no, ramificados o no, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), tal y como de 1 átomo de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono y/o de 4 átomos de carbono, substituidos o no, ramificados o no, preferiblemente no substituidos y no ramificados, aún más preferiblemente de 2 átomos de carbono (C<sub>2</sub>).

10 R1, R2, R3 y R4 pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, R1, R2, R3 y R4 están presentes, son iguales y son un grupo etilo,

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

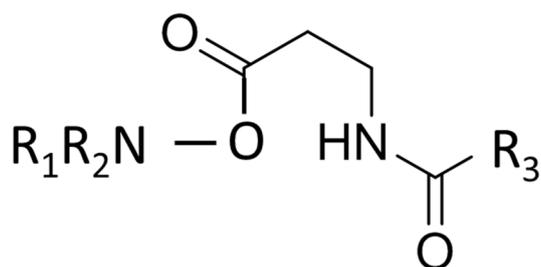
15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 5 es el anhídrido 3,3'-dietoxipropanoico, con fórmula (VII):



Fórmula (VII)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 6 tiene fórmula IVa:



Fórmula (IVa)

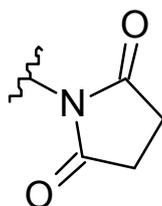
donde  $R_1$  corresponde a un átomo de H o a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono ( $C_1-C_6$ ), ramificado o no, sustituido o no, preferiblemente un grupo alquilo de 2 a 5 átomos de carbono ( $C_2-C_5$ ), tal y como de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, de 5 átomos de carbono, sustituido o no, ramificado o no, aún más preferiblemente un grupo alquilo de 4 átomos de carbono ( $C_4$ ) sustituido y ramificado;

donde  $R_2$  corresponde a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono ( $C_1-C_6$ ), ramificado o no, sustituido o no, preferiblemente un grupo alquilo de 2 a 5 átomos de carbono ( $C_2-C_5$ ), tal y como de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, de 5 átomos de carbono, sustituido o no, ramificado o no, aún más preferiblemente un grupo alquilo de 4 átomos de carbono ( $C_4$ ) sustituido y ramificado;

o

donde  $R_1$  y  $R_2$ , junto con el átomo de N al que están unidos forman un grupo heterocíclico con de 4 a 7 átomos de carbono, tal y como de 4, 5, 6 o 7 átomos de carbono, preferiblemente de 4 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con uno o más grupos oxo, tal y como con 1, 2, 3, o 4 grupos oxo, preferiblemente sustituido con al menos 2 grupos oxo.

En una realización preferida,  $-NR_1R_2$  corresponde a:



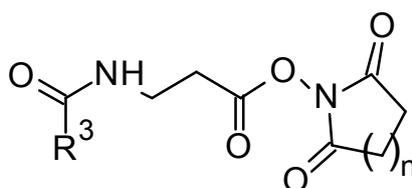
20

Y donde  $R_3$  corresponde a grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono ( $C_1-C_6$ ), preferiblemente un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ( $C_1-C_4$ ), tal y como de 1 átomos de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de

carbono, sustituidos o no, ramificado o no, preferiblemente no sustituido y no ramificado, aún más preferiblemente un grupo alquilo de 1 átomo de carbono (C<sub>1</sub>) no sustituido y no ramificado (un grupo metilo),

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización, Clav6 tiene fórmula IVb:

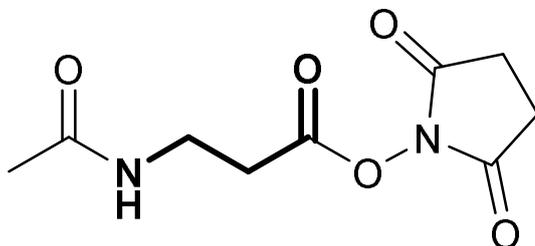


Fórmula (IVb)

Donde n = 1, 2 o 3 y donde R<sup>3</sup> corresponde a grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), preferiblemente un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), tal y como de 1 átomo de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, sustituidos o no, ramificado o no, preferiblemente no sustituido y no ramificado, aún más preferiblemente un grupo alquilo de 1 átomo de carbono (C<sub>1</sub>) no sustituido y no ramificado (un grupo metilo),

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

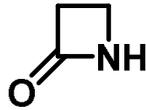
En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 6 es el éster 3-acetamidopropanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, con fórmula (VIII):



Fórmula (VIII)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

Clav 7 es la 2-azetidinona, con fórmula (V):



Fórmula (V)

5 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende o consiste en al menos un compuesto de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, de ahora en adelante composición de la invención.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la concentración del compuesto de la invención se encuentra entre 4 mM y 8 mM. Más preferiblemente la concentración del compuesto de la invención es 6 mM.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende al menos otro principio activo.

15 En otra realización preferida, la composición de la invención comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende o consiste en al menos un compuesto de la invención o la composición de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la forma farmacéutica de la invención se selecciona de la lista que consiste en: emplasto, pomada, pasta, crema, solución, suspensión, emulsión, loción, linimento, gel, hidrogel, hidrocoloide, espuma, polvo, o cualquiera de sus combinaciones.

25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la forma farmacéutica de la invención es una solución o suspensión.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende o consiste en al menos un compuesto de la invención, en la composición de la invención o en la forma farmacéutica de la invención.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención además comprende los elementos necesarios para la realización de un Test de Activación de Basófilos (TAB).

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención además comprende al menos un anticuerpo monoclonal fluorescente adecuado para la selección de basófilos y la determinación de la activación de los mismos, al menos un tampón de estimulación, al menos una solución de lisis de eritrocitos, al menos una solución de lavado y anti-IgE humana y N-Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina y/o al menos un control positivo del ensayo.

15 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al uso de al menos un compuesto de la invención, de la composición de la invención, de la forma farmacéutica de la invención o del kit o dispositivo de la invención en la elaboración de un medicamento.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al uso de al menos un compuesto de la invención, de la composición de la invención, de la forma farmacéutica de la invención o del kit o dispositivo de la invención en la elaboración de un medicamento para la prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico.

20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención, la forma farmacéutica de la invención o el kit o dispositivo de la invención se aplican sobre una muestra biológica aislada. Preferiblemente la muestra biológica aislada es sangre.

25 Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para la prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico de un individuo, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) cuantificar el porcentaje de basófilos activados en una muestra biológica aislada de dicho individuo en estado basal y

30 a') cuantificar el porcentaje de basófilos activados en una muestra biológica aislada de dicho individuo después de añadirle a la misma un compuesto de la invención, la composición de

la invención, la forma farmacéutica de la invención o aplicar el kit o dispositivo de la invención.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación del porcentaje de basófilos activados se realiza mediante los marcadores expresados en la superficie celular de los basófilos. En otra realización preferida del primer método de la invención, el marcador de activación de la superficie celular de los basófilos se selecciona de la lista que consiste en CD203c, CD63, CD13, CD107a, CD164, CD80, CD86, CD40L, HLA-DR, CD123, CRTh2, Ph-Creb, Ph-STAT5, Ph-S6rp, Ph-eIF4E y CREB. Preferiblemente el marcador de activación es CD63.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación del porcentaje de células que expresan el marcador de activación se realiza mediante citometría de flujo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer método de la invención además comprende:

b) calcular un índice de estimulación.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el "índice de estimulación" es el porcentaje de basófilos activados según el paso a) con respecto al porcentaje de basófilos activados en estado basal según el paso a').

20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso a) es sangre. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, adicionalmente, la sangre se incuba previamente con un tampón de estimulación y/o se centrifuga.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación de marcadores se realiza mediante citometría de flujo.

25 Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un método de prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a)-(b) del primer método de la invención, que además comprende:

30 c) asignar al individuo del paso a) al grupo de individuos con alergia al ácido clavulánico, cuando el índice de estimulación sea igual o mayor que 2, más preferiblemente mayor que 2,5, y aún más preferiblemente mayor 3.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Determinantes propuestos del ácido clavulánico correspondientes a los fragmentos resultantes tras su conjugación a proteínas (Determinante Antigénico I y Determinante Antigénico II) y estructuras equivalentes (Clav 1-Clav 7) para su evaluación en TAB.

**Figura 2.** Estructuras concretas empleadas en el TAB correspondientes a Clav 1- Clav 7 (nombre IUPAC en inglés y en español)

**Figura 3.** Resultados del TAB empleando estructuras CLV, Clav 1, Clav 2, Clav 3 y Clav 4, obtenidos en 25 pacientes selectivos a CLV y 15 controles tolerantes, expresados como índice de estimulación (IE). Análisis estadístico usando el test de Mann Whitney, diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) indicadas en la gráfica.

**Figura 4.** Análisis de los porcentajes de positividad en los resultados de TAB obtenidos en 25 pacientes selectivos a CLV (barras negras) y 15 controles tolerantes (barras blancas).

**Figura 5.** Resultados del TAB empleando el CLV, y las estructuras activadas Clav 2 y Clav 5. Arriba: 7 pacientes selectivos a CLV con alta respuesta a Clav 2 y 6 controles tolerantes. Abajo: 3 pacientes selectivos a CLV y 6 controles tolerantes. Análisis estadístico usando el test de Mann Whitney, diferencias significativas \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ) indicadas en la gráfica.

**Figura 6.** Análisis de los porcentajes de positividad en los resultados de TAB obtenidos en 7 pacientes selectivos a CLV (barras negras) y 6 controles tolerantes (barras blancas).

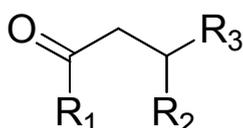
**Figura 7.** Resultados de la inhibición de la activación del basófilo con wortmanina (WTM) después de la estimulación con CLV, Clav 2 y Clav 5. Las barras muestran el índice de estimulación (IE) obtenido para la activación del basófilo sin inhibir e inhibida con WTM. Las diferencias significativas, analizadas con el test de Wilcoxon, se indican con \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han obtenido una serie de resultados que muestran que una serie concreta de estructuras relacionadas o del ácido clavulánico (Clav 2, Clav 5, Clav 6 y/o Clav 7) podrían resultar útiles en la prevención, cribado, identificación y/o diagnóstico de individuos con alergia al ácido clavulánico (CLV).

COMPUESTOS DE LA INVENCION

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a compuestos estructuralmente relacionados o derivados del ácido clavulánico, de fórmula general (I) o Clav, de ahora en adelante compuestos de la invención:



5

Fórmula (I) o Clav

donde

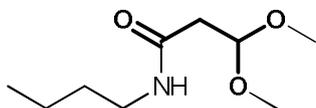
R1 son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluro, anhídridos, carbonato o éster.

10 R2 es un grupo que se selecciona de entre aldehído, alcoxi, o amino.

R3 es un grupo que se selecciona de entre hidrogeno, alcoxi, o grupos activantes de ácido como los haluros, anhídridos o carbonatos.

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

15 Preferiblemente, el compuesto de fórmula general (I) o Clav de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención es *N*-Butyl-3,3-dimetoxipropanamida, tal y como se indica en la siguiente fórmula (Fórmula Ia), o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones:



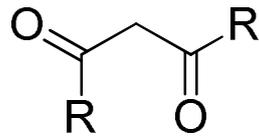
*N*-Butyl-3,3-dimethoxypropanamide  
*N*-Butil-3,3-dimetoxipropanamida

20

Fórmula (Ia)

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los compuestos de la invención se seleccionan de la lista que consiste en:

a) Clav 2, de fórmula (II):



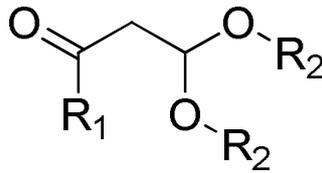
Fórmula (II)

donde

R son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluro, anhídrido o carbonato.

5 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones,

b) Clav 5, de fórmula (III):



Fórmula (III)

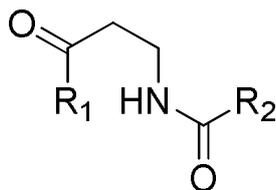
10 donde

R1 son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluro, anhídrido o carbonato.

R2 es un grupo alquilo.

15 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones,

c) Clav 6, de fórmula (IV):



Fórmula (IV)

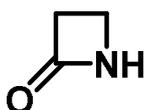
donde

R1 son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluro, anhídrido o carbonato.

R2 es un grupo alquilo.

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente  
5 aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, y/o

d) Clav 7, de fórmula (V) (2-azetidinona):

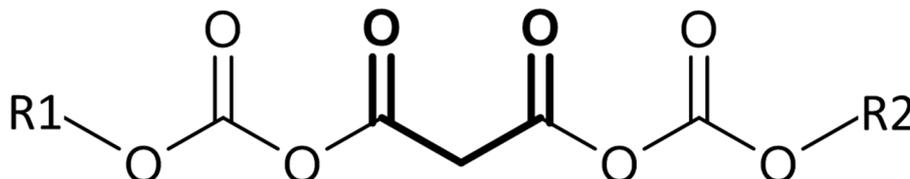


Fórmula (V)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente  
10 aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida sólo se utiliza un compuesto de la invención. En otra realización preferida se utiliza cualquier combinación de los compuestos de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 2 tiene fórmula (IIa):

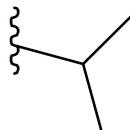


15 Fórmula (IIa)

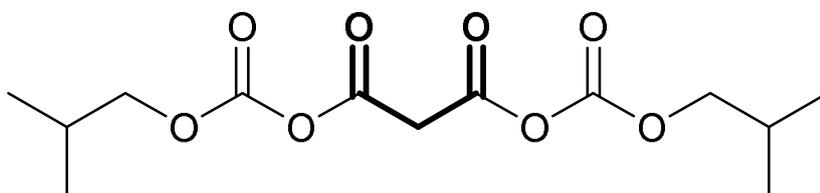
Donde R1 y R2 corresponden a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de Carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), tal y como tal y como de 1 átomo de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, de 5 átomos de carbono y/o de 6 átomos de carbono, substituidos o no, ramificados o no, preferiblemente de 1 a 4 átomos de Carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), más  
20 preferiblemente de 4 átomos de carbono (C<sub>4</sub>), substituidos o no, ramificados o no, preferiblemente no substituidos y ramificados.

R1 y R2 pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, R1 y R2 son iguales.

Preferiblemente, R1 y R2 son grupos alquilo de cuatro átomos de carbono, no sustituidos y ramificados, tal y como:



- 5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 2 es el anhídrido bis-((isobutoxicarbonil)oxi)-1,3-dioxopropanoico, con fórmula (VI):



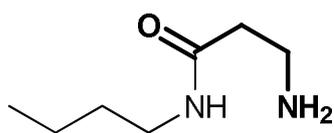
10

Fórmula (VI)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 3 es 3-amino-N-butylpropanamida, de Fórmula (IX), o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones:

15

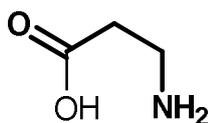


3-Amino-N-butylpropanamide  
3-Amino-N-butylpropanamida

Fórmula (IX)

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 4 es ácido 3-aminopropanoico, de Fórmula (X), o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones:

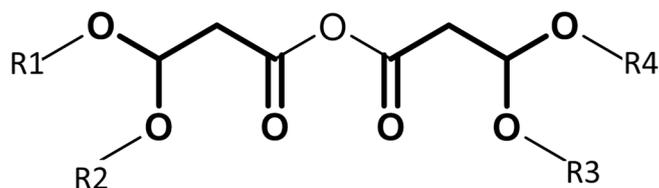
20



3-Aminopropanoic acid  
Ácido 3-aminopropanoico

Fórmula (X)

En una realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 5 tiene fórmula (IIIa):



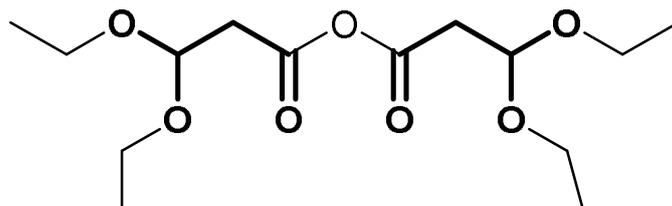
Fórmula (IIIa)

Donde R1, R2, R3 y R4, si están presentes, corresponden a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de Carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), sustituidos o no, ramificados o no, preferiblemente de 1 a 4 átomos de Carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), tal y como de 1 átomo de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono y/o de 4 átomos de carbono, sustituidos o no, ramificados o no, preferiblemente no sustituidos y no ramificados, aún más preferiblemente de 2 átomos de carbono (C<sub>2</sub>).

R1, R2, R3 y R4 pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, R1, R2, R3 y R4 están presentes, son iguales y son un grupo etilo (C<sub>2</sub>),

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 5 es el anhídrido 3,3-dietoxipropanoico, con fórmula (VII):

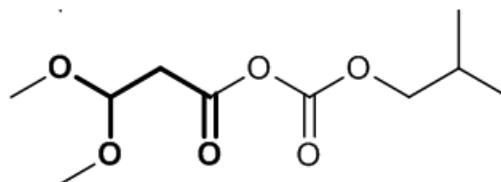


Fórmula (VII)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

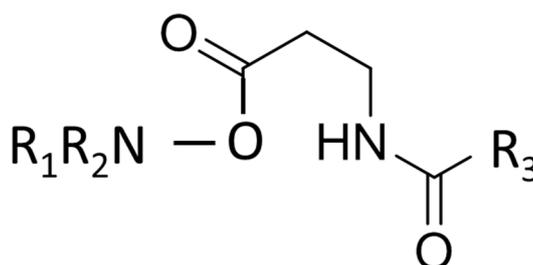
En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 5 es el anhídrido (isobutilcarbónico) 3,3-dimetoxipropanoico (Clav 5-bis, de Fórmula (XI)), o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones:

Clav 5-bis



Fórmula (XI)

En una realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 6 tiene fórmula (IVa):



Fórmula (IVa)

5

donde  $R_1$  corresponde a un átomo de H o a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono ( $C_1-C_6$ ), ramificado o no, sustituido o no, preferiblemente un grupo alquilo de 2 a 5 átomos de carbono ( $C_2-C_5$ ), tal y como de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, de 5 átomos de carbono, sustituido o no, ramificado o no, aún más preferiblemente un grupo alquilo cíclico de 4 átomos de carbono ( $C_4$ ) sustituido y ramificado;

10

Donde  $R_2$  corresponde a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono ( $C_1-C_6$ ), ramificado o no, sustituido o no, preferiblemente un grupo alquilo de 2 a 5 átomos de carbono ( $C_2-C_5$ ), tal y como de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, de 5 átomos de carbono, sustituido o no, ramificado o no, aún más preferiblemente un grupo alquilo cíclico de 4 átomos de carbono ( $C_4$ ) sustituido y ramificado;

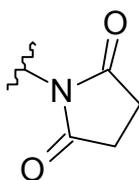
15

o

donde  $R_1$  y  $R_2$ , junto con el átomo de N al que están unidos forman un grupo heterocíclico con de 4 a 7 átomos de carbono, tal y como de 4, 5, 6 o 7 átomos de carbono, preferiblemente de 4 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con uno o más grupos oxo, tal y como con 1, 2, 3, o 4 grupos oxo, preferiblemente sustituido con al menos 2 grupos oxo.

20

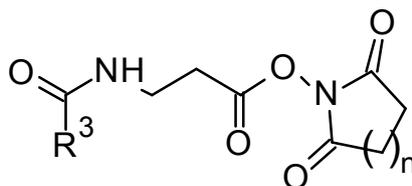
En una realización preferida,  $-NR_1R_2$  corresponde a:



5 y donde  $R_3$  corresponde a grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono ( $C_1$ - $C_6$ ), preferiblemente un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ( $C_1$ - $C_4$ ), tal y como de 1 átomos de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, substituido o no, ramificado o no, preferiblemente no substituido y no ramificado, aún más preferiblemente un grupo alquilo de 1 átomo de carbono ( $C_1$ ) no substituido y no ramificado (un grupo metilo),

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

10 En otra realización, Clav6 tiene fórmula (IVb):

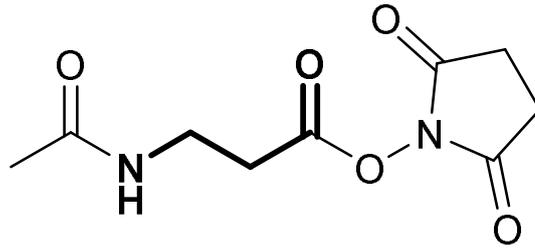


Fórmula (IVb)

15 Donde  $n = 1, 2$  o  $3$  y donde  $R^3$  corresponde a grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono ( $C_1$ - $C_6$ ), preferiblemente un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ( $C_1$ - $C_4$ ), tal y como de 1 átomos de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, de 4 átomos de carbono, substituido o no, ramificado o no, preferiblemente no substituido y no ramificado, aún más preferiblemente un grupo alquilo de 1 átomo de carbono ( $C_1$ ) no substituido y no ramificado (un grupo metilo),

20 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

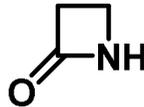
En otra realización preferida de este aspecto de la invención, Clav 6 es el éster 3-acetamidopropanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, con fórmula (VIII):



Fórmula (VIII)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

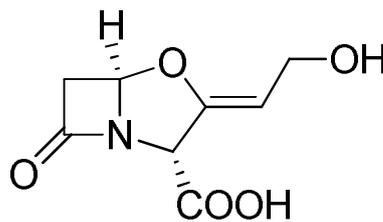
- 5 Clav 7 es la 2-azetidinona, con fórmula (V):



Fórmula (V)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

- 10 Por otro lado, en esta memoria se entiende por “ácido clavulánico” al ácido (3*R*,5*R*,*Z*)-2-(2-hidroxiethyliden)-7-oxo-1-oxa-4-aza-biciclo[3.2.0] heptano-3-carboxílico, de fórmula (XII) :



Fórmula (XII)

- 15 y número CAS 58001-44-8, es un inhibidor de la enzima betalactamasa, que se emplea para combatir la resistencia a los antibióticos betalactámicos que presentan las bacterias que secretan esta enzima. En su forma más común se encuentra como sal de clavulanato potásico.

COMPOSICIÓN DE LA INVENCION

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende o consiste en al menos un compuesto de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, de ahora en adelante composición de la invención.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la concentración del compuesto de la invención se encuentra entre 4 mM y 8 mM, más preferiblemente entre 5 mM y 7 mM, y aún más preferiblemente es 6 mM.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende al menos otro principio activo. Preferiblemente, la composición de la invención además comprende ácido clavulánico, y aún más preferiblemente ácido clavulánico en forma de sal potásica.

10 En otra realización preferida, la composición de la invención comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En otra realización preferida, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

Asimismo, dentro del alcance de la presente invención se encuentran los profármacos de las composiciones farmacéuticas de la invención. El término "prodroga" o "profármaco" tal y como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de la invención, tal y como un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitante: ésteres (incluyendo ésteres de 20 ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo o adicionada a una muestra biológica aislada de un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto, tal y como el compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la 25 biodisponibilidad del compuesto cuando se administra a un individuo o adicionada a una muestra biológica aislada de un individuo o que potencia la liberación del compuesto en un compartimento biológico. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

30 Dentro del alcance de la presente invención se encuentran los "derivados" que incluyen tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que puedan ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser

útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. Los derivados pueden incluir estereoisómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, o de centros quirales. Los estereoisómeros (enantiómeros, diaestereoisómeros, formas meso) y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el  
5 término estereoisómero también se refiere a cualquier mezcla de estereoisómeros (racémicos o mezclas en distintas proporciones de los distintos estereoisómeros). Los diaestereoisómeros, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Cualquiera de los compuestos de la invención puede estar en forma cristalina, o en estado  
10 líquido, por ejemplo aceites, como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal y como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto que puedan ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza  
15 del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en diagnóstico o terapia como composiciones farmacéuticas, los  
20 compuestos de la invención, sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tengan un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el  
25 principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

Por otro lado, hacemos notar que los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en las composiciones farmacéuticas de la invención son los  
30 adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con

5 otros fármacos o principios activos adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea, o no, a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento para la prevención de la alergia es una vacuna.

10 El término "medicamento" o "composición farmacéutica", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para diagnóstico de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, el medicamento se emplea para el diagnóstico de una enfermedad, y preferiblemente la enfermedad es enfermedad alérgica, más preferiblemente alergia al ácido clavulánico.

15 Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad diferente en el basófilo u otro efecto diferente en el diagnóstico o que afecte a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y que están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

20 La composición o composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, o en una muestra biológica aislada del mismo en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no  
25 tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica y/o conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración o empleo en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes  
30 inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo. Preferiblemente  
35 la composición de la invención va a ser añadida a una muestra biológica aislada,

preferiblemente sangre o un producto obtenido de la misma procedente de un mamífero, preferiblemente de un humano.

La concentración para obtener una cantidad efectiva para el diagnóstico dependerá del compuesto en cuestión. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad diagnósticamente efectiva" se refiere a la cantidad de compuesto que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos compuestos. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

10 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica. En este caso, la condición patológica trata de una reacción alérgica al ácido clavulánico

#### 15 FORMA FARMACÉUTICA DE LA INVENCIÓN

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende o consiste en al menos un compuesto de la invención o la composición de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la forma farmacéutica de la invención se selecciona de la lista que consiste en: emplasto, pomada, pasta, crema, solución, suspensión, emulsión, loción, linimento, gel, hidrogel, hidrocoloide, espuma, polvo, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la forma farmacéutica de la invención es una solución o suspensión.

25 En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos o compuestos en terapias o técnicas diagnósticas combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su empleo en el diagnóstico al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

#### 30 KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCIÓN

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende o consiste en al menos un compuesto de la invención, en la composición de la invención o en la forma farmacéutica de la invención.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención además comprende los elementos necesarios para la realización de un Test de Activación de Basófilos, por ejemplo aunque sin limitarnos, al menos un anticuerpo monoclonal fluorescente adecuado para la selección de basófilos y la determinación de la activación de los mismos, al menos un tampón de estimulación, al menos una solución de lisis de eritrocitos, al menos una solución de lavado y anti-IgE humana y N-Formil-Metionil-  
10 Leucil-Fenilalanina y/o al menos un control positivo del ensayo.

El kit o dispositivo de la invención puede incluir otro dispositivo adicional para la toma de la muestra biológica aislada (preferiblemente sangre).

El “Test de Activación de Basófilos” o “TAB” es una prueba funcional *in vitro* que detecta la activación de los basófilos tras un estímulo con un antígeno específico detectando la  
15 expresión de marcadores de activación en la superficie celular y que normalmente se monitoriza por citometría de flujo empleando anticuerpos monoclonales fluorescentes. Por tanto, este test es utilizado para el diagnóstico alergológico *in vitro*. La técnica comprende varios pasos: extracción de sangre y preparación de la disolución o suspensión, estimulación con alérgeno/s, marcaje celular con anticuerpos fluorescentes que discrimine  
20 los basófilos activados y conteo en citómetro de flujo. La técnica puede desarrollarse tomando como sustrato la sangre total o la fracción de leucocitos y plaquetas (“buffy coat”) previamente aislada de la muestra de sangre total.

#### USOS MÉDICOS DE LA INVENCION

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al uso de al menos un compuesto de la  
25 invención, de la composición de la invención, de la forma farmacéutica de la invención o del kit o dispositivo de la invención en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a el/los compuesto/s de la invención, la composición de la invención, la forma farmacéutica de la invención o el kit o dispositivo de la invención para su uso en medicina.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al uso de al menos un compuesto de la  
30 invención, de la composición de la invención, de la forma farmacéutica de la invención o del kit o dispositivo de la invención en la elaboración de un medicamento para la prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico, o alternativamente, al/los compuesto/s de la invención, la composición de la invención, la forma farmacéutica de

la invención o el kit o dispositivo de la invención para su uso en la prevención, identificación y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención, la forma farmacéutica de la invención o el kit o dispositivo de la invención se aplican sobre  
5 una muestra biológica aislada. Preferiblemente la muestra biológica aislada es sangre.

Adicionalmente, al menos un compuesto de la invención, la composición de la invención, la forma farmacéutica de la invención o el kit o dispositivo de la invención pueden usarse en otros ensayo *in vitro*, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, en inmunoensayos, test de liberación de histamina, test de proliferación linfocitaria, ELISpot) e *in vivo* (prueba cutánea)  
10 para el diagnóstico de alergia a CLV.

### MÉTODOS DE LA INVENCIÓN

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para la prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico de un individuo, de ahora en adelante primer método de la invención, que  
15 comprende:

a) cuantificar el porcentaje de basófilos activados en una muestra biológica aislada de dicho individuo en estado basal y

a') cuantificar el porcentaje de basófilos activados en una muestra biológica aislada de dicho individuo después de añadirle a la misma un compuesto de la invención, la composición de  
20 la invención, la forma farmacéutica de la invención o aplicar el kit o dispositivo de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación del porcentaje de basófilos activados se realiza mediante los marcadores expresados en la superficie celular de los basófilos. En otra realización preferida del primer método de la invención, el  
25 marcador de activación de la superficie celular de los basófilos se selecciona de la lista que consiste en CD203c, CD63, CD13, CD107a, CD164, CD80, CD86, CD40L, HLA-DR, CD123, CRTh2, Ph-Creb, Ph-STAT5, Ph-S6rp, Ph-eIF4E y CREB. Preferiblemente el marcador de activación es CD63.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación del porcentaje  
30 de células que expresan el marcador de activación se realiza mediante citometría de flujo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer método de la invención además comprende:

b) calcular un índice de estimulación.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el “índice de estimulación” es el porcentaje de basófilos activados según el paso a) con respecto al porcentaje de basófilos activados en estado basal según el paso a’).

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso a) es sangre. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, adicionalmente, la sangre se incuba previamente con un tampón de estimulación y/o se centrifuga.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación de marcadores se realiza mediante citometría de flujo.

15 Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un método de prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a)-(b) del primer método de la invención, que además comprende:

c) asignar al individuo del paso a) al grupo de individuos con alergia al ácido clavulánico, cuando el índice de estimulación sea igual o mayor que 2, más preferiblemente mayor que 2,5, y aún más preferiblemente mayor 3.

20 Alternativamente, el primer método de la invención comprende los siguientes pasos:

a) cuantificar la cantidad de anticuerpo IgE en una muestra biológica aislada de dicho individuo después de añadirle a la misma un compuesto de la invención, la composición de la invención, la forma farmacéutica de la invención o aplicar el kit o dispositivo de la invención.

25 b) comparar la cantidad obtenida en el paso a) con una muestra control negativa, donde la muestra control negativa es una muestra del mismo individuo del paso sin añadirle nada.

c) asignar al individuo del paso a) al grupo de individuos con alergia al ácido clavulánico, cuando el valor obtenido en el paso a) es superior al control negativo descrito en el paso b)

30 El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación del resultado de la amplificación de la muestra biológica a analizar,

también llamada muestra biológica problema, con una amplificación de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Las comparaciones descritas en los métodos de la presente invención pueden ser realizadas  
5 manualmente o asistida por ordenador.

Un "individuo" o "sujeto", como se usa aquí, se refiere a un mamífero, humano o no humano, en observación, y más preferiblemente un ser humano. El individuo puede ser cualquiera, un individuo predispuesto a la alergia al ácido clavulánico o un individuo que padece la alergia.

Los pasos (a)-(a') y/o (b), del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente  
10 automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la cuantificación en el paso (a)-(a') o la comparación en el paso (b).

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una  
15 portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito  
20 integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un  
25 disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier  
30 medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención.

Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 15 EJEMPLO DE LA INVENCION

Método que permite la evaluación de reacción alérgica inmediata a ácido clavulánico con una sensibilidad adecuada. El empleo de unas estructuras relacionadas con el ácido clavulánico (con fórmulas Clav 2, Clav 5 y Clav 6 descritas en figura 1) en el test de activación de basófilos (TAB) eleva significativamente la sensibilidad de la técnica comparado con el empleo de la molécula de ácido clavulánico *per sé*.

### *Resultados*

Se han sintetizado moléculas derivadas del CLV que corresponden a los diferentes determinantes propuestos: determinante antigénico I (derivado aldehído: tipo oxopropanamida; Clav 1, Clav 2 y Clav 5) y determinante antigénico II (derivado amina: tipo  $\beta$ -alanina; Clav 3, Clav 4, Clav 6 y Clav 7). Ver Figura 1.

Este tipo de estructuras junto con CLV "per se" se han evaluado en el TAB en sujetos selectivos a CLV. Ver estructuras concretas empleadas en Figura 2.

En una primera fase se han ensayado las estructuras Clav 1, Clav 2, Clav 3 y Clav 4 a diferentes concentraciones (5, 1 y 0.2mM) en 25 pacientes selectivos a CLV y en 15 controles tolerantes. Los resultados se muestran en la Figura 3, en la que se observa que sólo Clav 2 dio resultados positivos (a la concentración más alta), incluso en aquellos

pacientes con TAB a CLV negativos. El índice de estimulación con Clav 2 fue significativamente mayor en pacientes comparado con controles tolerantes ( $p < 0.0001$ ).

El porcentaje de casos positivos se analizó utilizando un punto de corte para CLV  $> 1.5$  y para Clav 2  $> 3$ , según los resultados obtenidos en las curvas ROC, y se representa en la Figura 4. Se observó que, en pacientes selectivos a CLV, el porcentaje de casos positivos se elevó de un 24% con CLV a un 56% con Clav 2 y a un 64% si se combinaban ambos resultados. En el caso de los sujetos tolerantes, el porcentaje de casos positivos fue de 13.3% con CLV, de 33.3% con Clav2 y de 33.3% con la combinación de ambos.

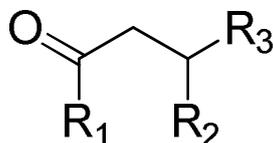
Posteriormente se realizó el TAB con una nueva estructura, Clav 5, que al igual que Clav 2, presentaba mayor capacidad de unión a proteínas. Se ensayaron Clav 2 y Clav 5 a un rango mayor de concentraciones (8, 4, 2 y 1mM) en 7 pacientes positivos a Clav 2 en el ensayo anterior y en 6 controles, obteniendo índices de estimulación mayores para ambas estructuras en pacientes comparado con controles a las concentraciones más altas ( $p = 0.003$  para Clav 2 y  $p = 0.015$  para Clav 5 a 8mM;  $p = 0.015$  para Clav 2 a 4mM), resultados mostrados en Figura 5. Utilizando el mismo punto de corte que en el ensayo anterior se analizó el porcentaje de positividad, como se muestra en la Figura 6. El porcentaje de casos positivos para el Clav 2 es 85.7% y para el Clav 5 es 71.4%. En este caso no obtuvimos ningún caso positivo para Clav 2 entre los controles tolerantes y un 28.6% para Clav 5.

Por último realizamos un ensayo de inhibición de la vía de activación del basófilo mediada por IgE, utilizando WTM, con ambas estructuras (Clav 2 y Clav 5). Los resultados del TAB incluyendo la incubación previa con WTM a  $1\mu\text{M}$  ( $p = 0.002$  para Clav2 y  $p = 0.001$  para Clav 5 a 8mM;  $p = 0.001$  para Clav 2 y  $p = 0.001$  Clav 5 a 4mM) demostraron que la activación del basófilo es específica y mediada por IgE (Figura 7).

Las estructuras derivadas del determinante antigénico I que tienen capacidad de unirse a proteínas (Clav 2 y Clav 5) activan a los basófilos de los pacientes selectivos a CLV vía IgE. Estas moléculas incrementan significativamente la sensibilidad del TAB para el diagnóstico de pacientes con reacciones inmediatas a CLV.

**REIVINDICACIONES**

1.- Compuestos estructuralmente relacionados o derivados del ácido clavulánico de fórmula general (I), o Clav:



5

Fórmula (I) o Clav

donde

R1 son grupos activantes de ácido que se seleccionan de entre haluros, anhídridos o carbonatos o éster,

R2 es un grupo que se selecciona de entre aldehído, alcoxi, o amino,

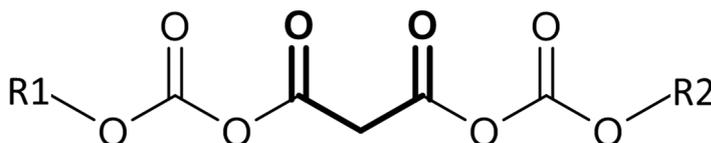
10 R3 es un grupo que se selecciona de entre hidrogeno, alcoxi, o grupos activantes de ácido como los haluros, anhídridos o carbonatos;

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones;

y donde dichos compuestos estructuralmente relacionados o derivados del ácido clavulánico

15 se seleccionan del grupo que consiste en:

a) Clav 2, de fórmula (IIa):

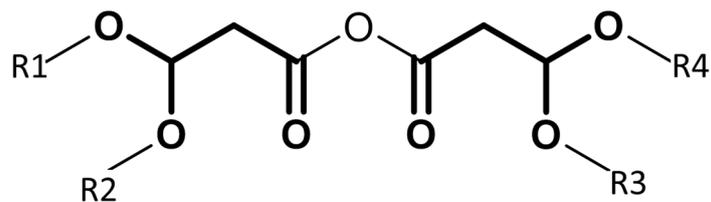


Fórmula (IIa)

20 donde R1 y R2 corresponden a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), sustituido o no, ramificado o no,

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones; y

b) Clav 5, de fórmula (IIIa):



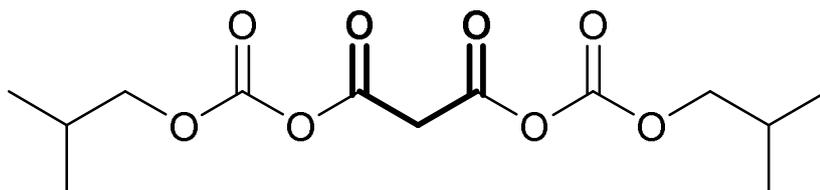
Fórmula (IIIa)

donde R1, R2, R3 y R4, corresponden a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), sustituido o no, ramificado o no,

5 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones;

2.- Los compuestos según la reivindicación 1, donde Clav 2 es el anhídrido bis-((isobutoxicarbonil)oxi)-1,3-dioxopropanoico, con fórmula (VI):

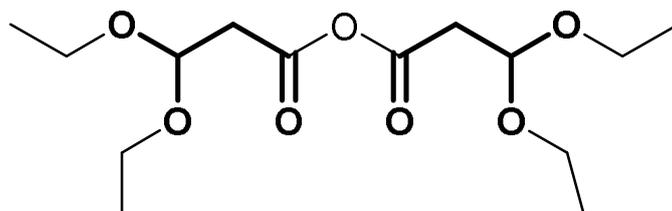
10



Fórmula (VI)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente  
15 aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

3.- Los compuestos según la reivindicación 1, donde Clav 5 es el anhídrido 3,3-dietoxipropanoico, con fórmula (VII):



Fórmula (VII)

20 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

- 4.- Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la concentración de Clav 2 y/o Clav 5 se encuentra entre 4-8 mM.
- 5.- Una composición que comprende un compuesto según la reivindicación 4 donde la concentración de Clav 2 y/o Clav 5 es 6 mM.
- 5 6.- Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende al menos otro principio activo.
- 7.- Una composición que comprende un compuesto cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 8.- Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 1 a 7, que además comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 9.- Forma farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10.- La forma farmacéutica según la reivindicación anterior que se selecciona de la lista que consiste en: emplasto, pomada, pasta, crema, solución, suspensión, emulsión, loción, 15 linimento, gel, hidrogel, hidrocoloide, espuma, polvo, o cualquiera de sus combinaciones.
- 11.- La forma farmacéutica según la reivindicación 10 donde dicha forma farmacéutica es una solución o suspensión.
- 12.- Kit o dispositivo que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 13.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que además comprende los elementos necesarios para la realización de un Test de Activación de Basófilos (TAB).
- 14.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, donde dicho kit además comprende al menos un anticuerpo monoclonal fluorescente adecuado para la selección de basófilos y la determinación de la activación de los mismos, al menos un 25 tampón de estimulación, al menos una solución de lisis de eritrocitos, al menos una solución de lavado y anti-IgE humana y N-Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina y/o al menos un control positivo del ensayo.
- 15.- Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, de una composición según cualquiera de las reivindicación 4 a 8, de la forma farmacéutica según 30 cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la elaboración de un medicamento.

- 16.- Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, de una composición según cualquiera de las reivindicación 4 a 8, de la forma farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en la elaboración de un medicamento para la prevención, 5 identificación, cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico.
- 17.- El uso según la reivindicación anterior, donde el compuesto, la composición o el kit o dispositivo se aplican sobre una muestra biológica aislada.
- 18.- El uso según la reivindicación anterior, donde la muestra biológica aislada es sangre.
- 19.- Método *in vitro* de obtención de datos útiles para la identificación, cribado y/o 10 diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico de un individuo, que comprende:
- a) cuantificar el porcentaje de basófilos activados en una muestra biológica aislada de dicho individuo en estado basal y
  - a') cuantificar el porcentaje de basófilos activados en una muestra biológica aislada de dicho individuo después de añadirle a la misma al menos un compuesto según cualquiera 15 de las reivindicaciones 1 a 3, de una composición según cualquiera de las reivindicación 4 a 8, de la forma farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.
- 20.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:
- b) calcular un índice de estimulación
- 20 21.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, donde la cuantificación del porcentaje de basófilos activados del paso a) se realiza utilizando el nivel de expresión de al menos un marcador de superficie celular de los basófilos.
- 22.- El método según la reivindicación anterior, donde los marcadores de activación de la superficie celular de los basófilos se seleccionan de la lista que consiste en CD203c, CD63, 25 CD13, CD107a, CD164, CD80, CD86, CD40L, HLA-DR, CD123, CRTh2, Ph-Creb, Ph-STAT5, Ph-S6rp, Ph-eIF4E y CREB.
- 23.- El método según la reivindicación 22 donde el marcador de activación de la superficie de celular de los basófilos es el CD63.
- 24.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, donde el índice de 30 estimulación es el porcentaje de basófilos activados en la cuantificación del paso a') respecto al porcentaje de basófilos activados en el estado basal del paso a).

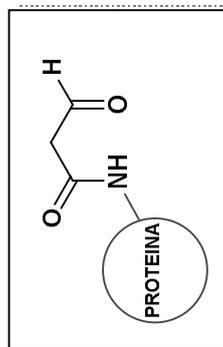
25.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, donde la muestra biológica aislada del paso a) es sangre.

26.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, donde adicionalmente, la sangre se incuba previamente con un tampón de estimulación y/o se centrifuga.

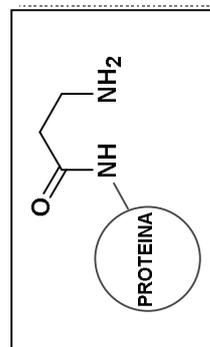
5 27.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, donde la cuantificación de marcadores se realiza mediante citometría de flujo.

28.- Un método de prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la alergia al ácido clavulánico, que comprende los pasos (a)-(b) según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, que además comprende:

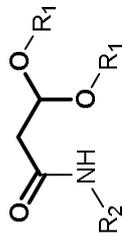
10 c) asignar al individuo del paso a') al grupo de individuos con alergia al ácido clavulánico, cuando el índice de estimulación calculado en el paso b) sea igual o mayor que 2, más preferiblemente mayor 2,5, y aún más preferiblemente mayor que 3.



Determinante Antigénico I

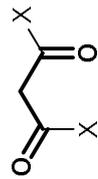


Determinante Antigénico II



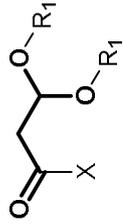
Clav 1

R<sub>1</sub>= Alquilo  
R<sub>2</sub>= Alquilo



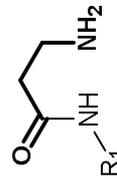
Clav 2

X= Grupos activantes de ácido, como tipo haluros, anhídridos y carbonatos.



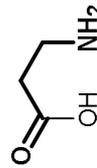
Clav 5

X= Grupos activantes de ácido, como tipo haluros, anhídridos y carbonatos.  
R<sub>1</sub>= Alquilo

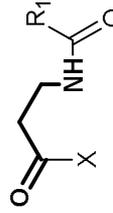


Clav 3

R<sub>1</sub>= Alquilo

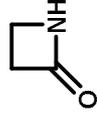


Clav 4



Clav 6

X= Grupos activantes de ácido, tipo haluros, anhídridos y carbonatos.  
R<sub>1</sub>= Alquilo



Clav 7

Fig.1

MOLÉCULAS CONCRETAS ENSAYADAS

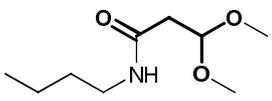
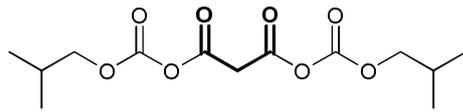
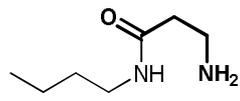
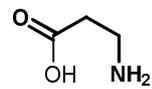
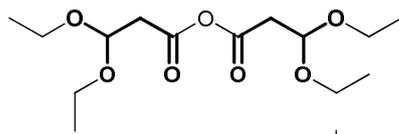
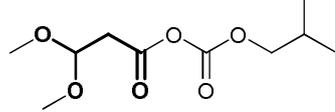
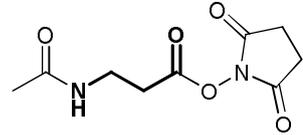
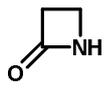
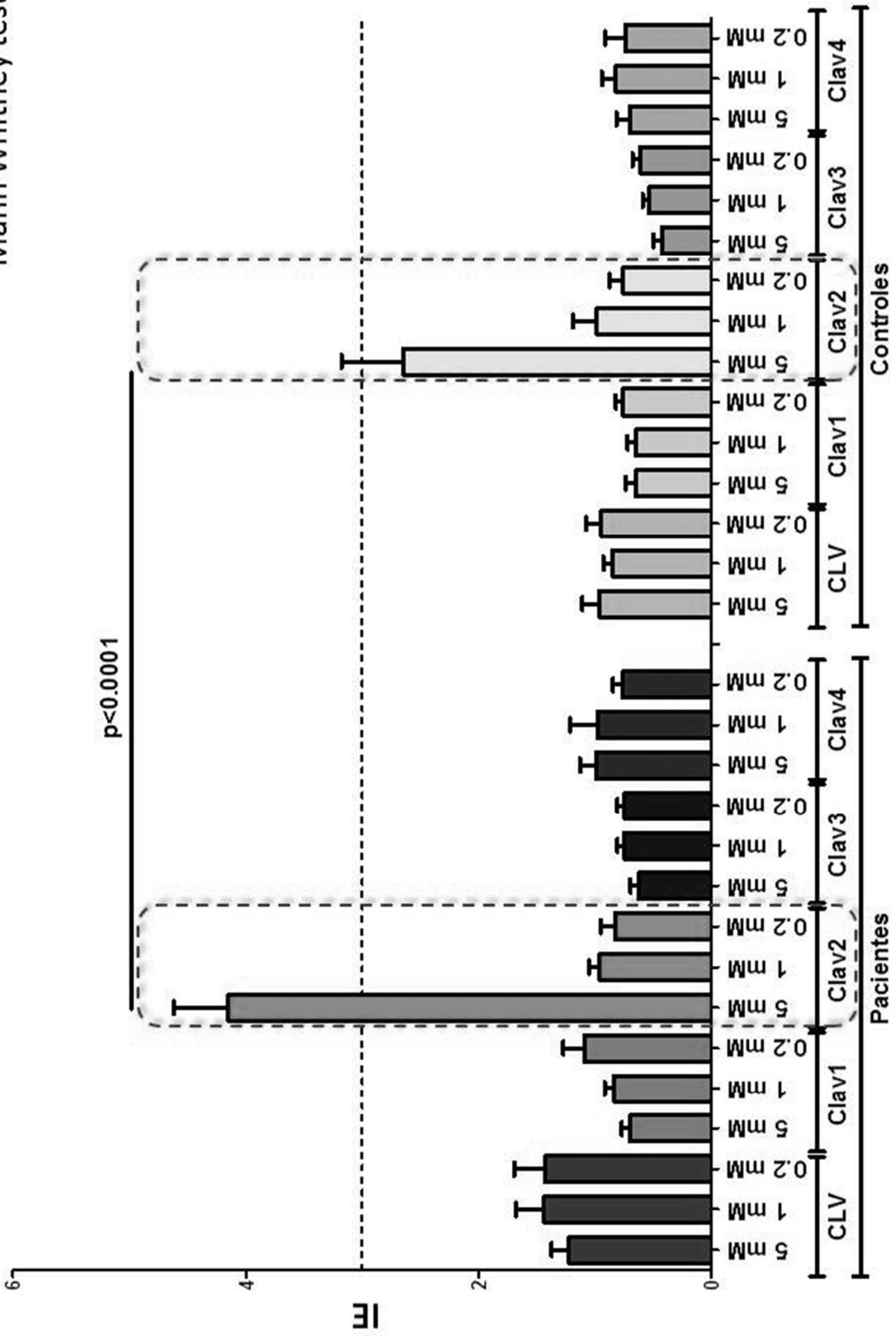
NOMBRE ABREVIADO	ESTRUCTURA	NOMBRE (IUPAC)
Clav 1		<i>N</i> -Butyl-3,3-dimethoxypropanamide <i>N</i> -Butil-3,3-dimetoxipropanamida
Clav 2		bis-((Isobutoxycarbonyl)oxy)-1,3-dioxopropanoic anhydride Anhídrido bis-((isobutoxicarbonil)oxi)-1,3-dioxopropanoico
Clav 3		3-Amino- <i>N</i> -butylpropanamide 3-Amino- <i>N</i> -butilpropanamida
Clav 4		3-Aminopropanoic acid Ácido 3-aminopropanoico
Clav 5		3,3-Diethoxypropanoic anhydride Anhídrido 3,3-dietoxipropanoico
Clav 5-bis		(Isobutyl carbonic) 3,3-dimethoxypropanoic anhydride Anhídrido (isobutilcarbónico) 3,3-dimetoxipropanoico
Clav 6		2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-3-acetamidopropanoate 3-Acetamidopropanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo
Clav 7		Azetidinone Azetidinona

Fig.2

Mann Whitney test



Intervalo reacción-estudio > 24 meses

Fig.3

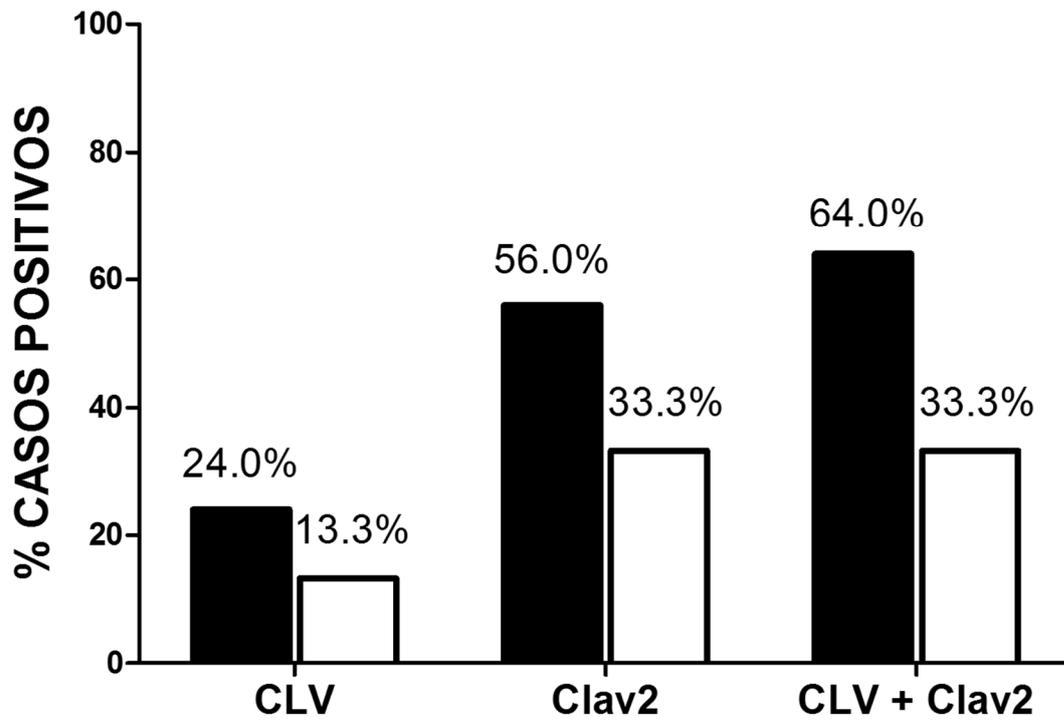


Fig.4

➤ 2. Test de activación de basófilos con estructuras activadas:

- 7 pacientes selectivos a CLV con alta respuesta a Clav2
- 6 controles tolerantes

Mann Whitney test  
 \* p<0.05 \*\* p<0.01

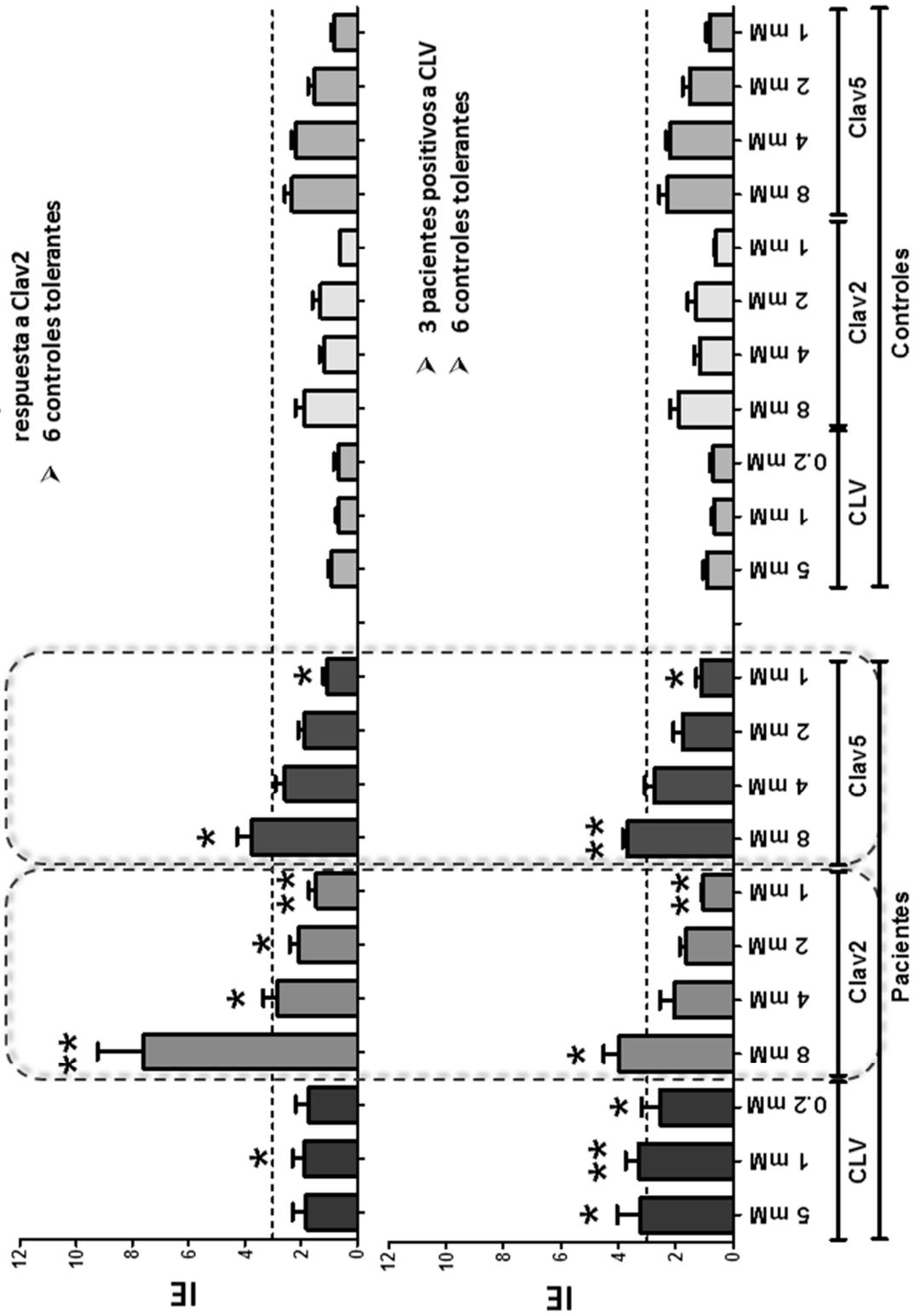


Fig.5

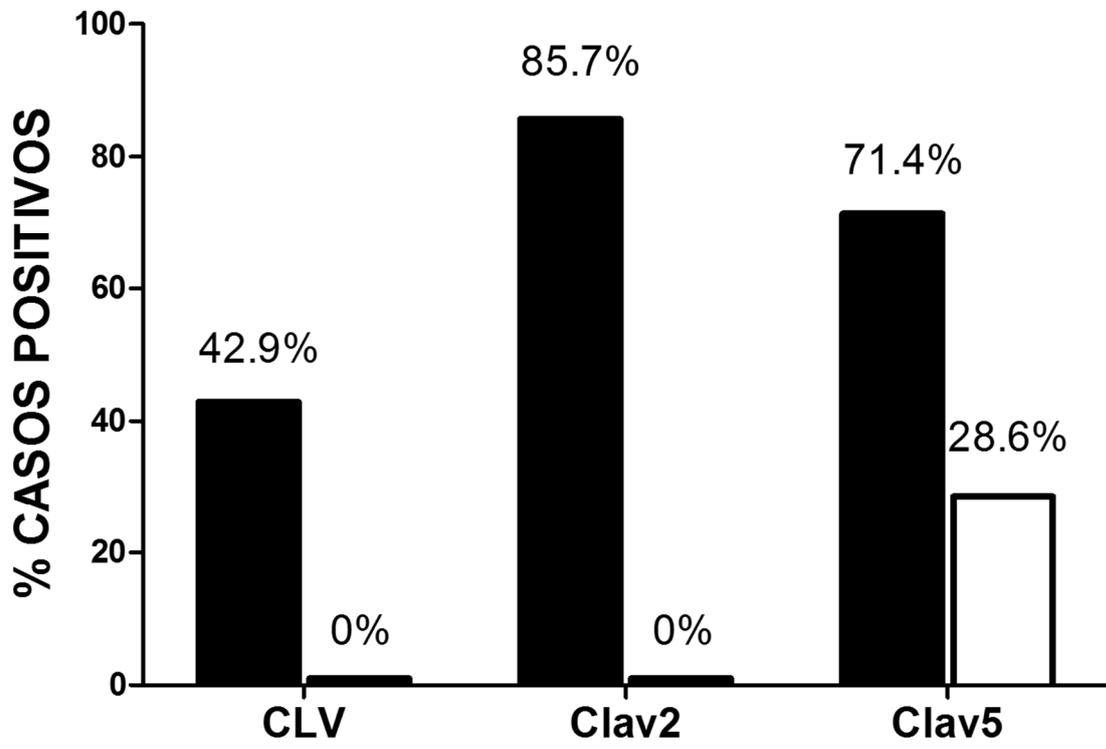


Fig.6

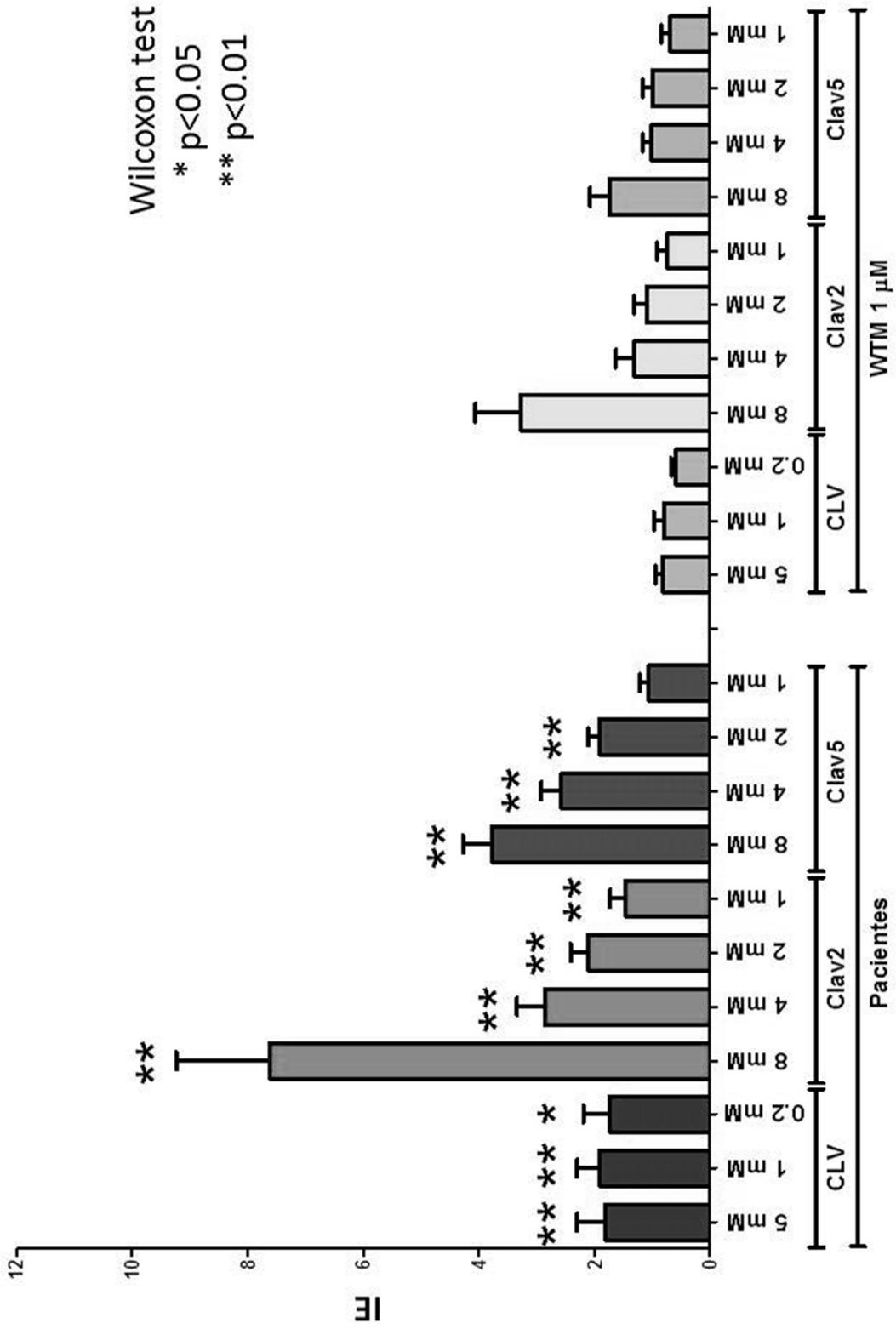


Fig.7