

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 600**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/536** (2006.01)

**C07K 16/44** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/US2013/023051**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13743365 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2810072**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección de metabolitos de metadona**

30 Prioridad:

**02.02.2012 US 201213364718**

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

**05.11.2019**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.  
(100.0%)**

**511 Benedict Avenue  
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**LELE, BHALCHANDRA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 729 600 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).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la detección de metabolitos de metadona

## Antecedentes

5 Esta invención se refiere a compuestos, métodos y kits para la determinación de metabolitos de metadona en muestras, tales como muestras de pacientes, de quienes se sabe o se sospecha que contienen dichos metabolitos de metadona.

10 La metadona se usa en el manejo del dolor y en el tratamiento de la adicción a los opiáceos, ya sea a partir de opioides naturales o de opioides producidos sintéticamente como, por ejemplo, la heroína. Es necesario controlar el cumplimiento del tratamiento con metadona para prevenir el uso ilegal del medicamento recetado. La monitorización de la concentración de metadona no es muy confiable, ya que una parte significativa de la población de pacientes tiene una alta tasa de metabolización de la metadona, lo que puede resultar en una determinación incorrecta con respecto al tema del cumplimiento. Además, los pacientes que no cumplen pueden agregar metadona a sus muestras, lo que puede indicar erróneamente el cumplimiento. La metadona se metaboliza principalmente en un metabolito farmacológicamente inactivo 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP) aunque también se forman otros metabolitos.

15 Existe una necesidad continua de ensayos para determinar con precisión uno o ambos de una presencia y una cantidad de un metabolito de metadona en muestras sospechosas de contener el mismo.

## Resumen

20 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento se dirigen a un compuesto que comprende una unidad estructural seleccionada del grupo que consiste en unidades estructurales de etiqueta de poli(aminoácido), unidades estructurales de etiqueta de no poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de vehículos inmunogénicos poli(aminoácido) y no-poli(aminoácidos), unidos a 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina en la posición 3 de uno de los anillos de fenilo.

25 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento están dirigidos a métodos de ensayo que utilizan los compuestos mencionados anteriormente para la detección de 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina en una muestra de la que se sospecha que contiene 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina.

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación de un ejemplo de un esquema de reacción para preparar compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

30 La Figura 2 es una representación de un ejemplo de un esquema de reacción para preparar compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La Figura 3 es una representación de un ejemplo de un esquema de reacción para preparar compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

35 La Figura 4 es una representación de un ejemplo de un esquema de reacción para preparar compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La Figura 5 es una representación de un ejemplo de un esquema de reacción para preparar compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La Figura 6 es una representación de un ejemplo de un esquema de reacción para preparar compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

40 La Figura 7 es una representación de un ejemplo de un esquema de reacción para preparar compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

## Descripción detallada de realizaciones específicas

## Conjugados EDDP

45 Los presentes inventores han descubierto que los compuestos en los que una unidad estructural está unida a 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP) en una posición meta (posición 3) de un anillo de fenilo de EDDP son útiles como inmunógenos para generar anticuerpos para EDDP y como entidades marcadas para uso en ensayos para EDDP. Como resultado, la EDDP se puede monitorizar con un ensayo preciso y sensible como parte de la determinación del cumplimiento de un sujeto con la terapia con metadona.

50 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí se dirigen a un compuesto que comprende una unidad estructural, seleccionada del grupo que consiste en unidades estructurales de etiqueta de poli(aminoácido), unidades

- estructurales de etiqueta de no-poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos no-poli(aminoácidos) unidos a 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina en la posición 3 de uno de los anillos de fenilo. Cuando la unidad estructural es un portador inmunogénico, los compuestos pueden emplearse para generar anticuerpos para la EDDP. Cuando la unidad estructural es una unidad estructural marcadora, los compuestos pueden emplearse como entidades marcadoras en ensayos para la detección de EDDP.
- El término "unidades estructurales de etiqueta de poli(aminoácido)" incluye etiquetas que son proteínas tales como, pero sin limitación, enzimas, anticuerpos, péptidos e inmunógenos, por ejemplo. Con proteínas marcadoras como, por ejemplo, enzimas, el rango de peso molecular será de aproximadamente 10000 a aproximadamente 600000, o de aproximadamente 10000 a aproximadamente 300000 de peso molecular. Generalmente hay al menos aproximadamente 1 análogo de EDDP por aproximadamente 200000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 150000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 100000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 50000 de peso molecular, por ejemplo. En el caso de las enzimas, el número de grupos análogos de EDDP suele ser de 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 2 a aproximadamente 15, aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o aproximadamente 6 a aproximadamente 10.
- Las enzimas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas rédox tales como, por ejemplo, deshidrogenasas, por ejemplo, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa; enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor a un colorante tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa y microperoxidasa; hidrolasas tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa; luciferasas tales como, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; transferasas; combinaciones de enzimas tales como, pero no limitadas a, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasa, o oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, junto con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte, que es peroxidasa como la peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa o microperoxidasa, por ejemplo.
- El término "etiquetas no-poli(aminoácidos)" incluye aquellas etiquetas que no son proteínas. La etiqueta de no-poli(aminoácido) se puede detectar directamente o es detectable a través de una reacción de unión específica que produce una señal detectable. El marcador no-poli(aminoácido) puede ser isotópico o no isotópico y puede ser, a título ilustrativo y no limitativo, un radioisótopo, un compuesto luminiscente, un polinucleótido que codifica un catalizador, un promotor, un tinte, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radioactivo, una molécula orgánica pequeña (que incluye, por ejemplo, biotina, moléculas fluorescentes y moléculas quimioluminiscentes), una secuencia de polinucleótidos amplificable, un soporte como, por ejemplo, una placa, una partícula (incluida una perla) como látex o partícula de carbono o dióxido de cromo (cromo) o similar, sol de metal, cristalita, liposoma, célula, etc., que pueden o no estar marcados con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo.
- Una etiqueta de poli(aminoácido) o una etiqueta de no-poli(aminoácido) puede ser un miembro de un sistema productor de señales. El sistema productor de señales puede tener uno o más componentes, siendo al menos un componente la etiqueta, ya sea poli(aminoácido) o no-poli(aminoácido). El sistema que produce la señal genera una señal que se relaciona con la presencia de un compuesto de sirolimus en una muestra. El sistema de producción de señales incluye todos los reactivos necesarios para producir una señal medible. Otros componentes del sistema que produce la señal pueden incluirse en una solución de revelador y pueden incluir sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos, sustancias de unión específica requeridas para la unión de sustancias que generan señales, y similares. Otros componentes del sistema productor de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, y similares. El sistema de producción de señales proporciona una señal detectable por medios externos, mediante el uso de radiación electromagnética, deseablemente por examen visual. Los sistemas de -producción de señales ejemplares se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5,508,178 (Rose, et al.).
- Los portadores inmunogénicos incluyen ciertos poli(aminoácidos) y no-poli(aminoácidos). Por el término "portador inmunogénico" se entiende un grupo que, cuando se conjuga con un hapteno y se inyecta en un mamífero, inducirá una respuesta inmune y provocará la producción de anticuerpos que se unen al hapteno. Los haptenos son compuestos capaces de unirse específicamente a los anticuerpos correspondientes, pero no actúan ellos mismos como inmunógenos (o antígenos) para la preparación de los anticuerpos. Los anticuerpos que reconocen un hapteno pueden prepararse contra compuestos que comprenden el hapteno unido a un portador inmunogénico (o antigénico). Los portadores inmunogénicos también pueden denominarse portadores antigénicos. Los portadores inmunogénicos típicos incluyen, sin limitación, poli(aminoácidos), polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas (materiales biológicos y sintéticos). Una amplia variedad de tales portadores se describe en Davalian, et al., Patente de Estados Unidos No. 5,089,390, columna 4, línea 57 a columna 5, línea 5.
- El rango de peso molecular para los poli(aminoácidos) que son portadores inmunogénicos, como los antígenos proteicos, es de aproximadamente 5000 a aproximadamente 1000000, o de aproximadamente 20000 a aproximadamente 600000, o de aproximadamente 25000 a aproximadamente 250000 de peso molecular. Los vehículos inmunogénicos de poli(aminoácido) incluyen, pero no se limitan a, proteínas tales como, por ejemplo, albúminas, proteínas de suero, por ejemplo, globulinas, proteínas de lente ocular y lipoproteínas, por ejemplo. Las proteínas ilustrativas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana ("KLH"), ovoalbúmina de huevo y gamma-globulina bovina (BGG), por ejemplo. Los vehículos

inmunogénicos que no son poli(aminoácidos) incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos, partículas, poli(lisinas) y poli(etilenglicoles), por ejemplo.

5 Como se mencionó anteriormente, el portador inmunogénico puede ser un polisacárido, que es un polímero de alto peso molecular de monosacáridos que puede prepararse de forma natural o sintética y generalmente implica condensaciones repetidas de monosacáridos. Ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa, gomas de carbohidratos, tales como goma arábica, agar, etc. El polisacárido también puede contener residuos de poli(aminoácidos) y/o residuos lipídicos.

10 El término "soporte" incluye cualquier material insoluble en agua, orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como partículas, incluyendo talón, película, membrana, tubo, pozo, tira, varilla, superficies planas como, por ejemplo, placa, dendrímeros y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no ser suspendible en el medio en donde se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-  
15 metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), poliestireno, poli(etil butirato), por ejemplo; ya sea por sí mismos o en conjunto con otros materiales. Otros soportes incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos, particularmente polisacáridos reticulados, tales como agarosa, dextrano, celulosa y almidón, por ejemplo.

20 Un grupo de enlace como se describe en este documento puede emplearse para unirse al análogo de EDDP de acuerdo con los principios descritos en este documento a un soporte sólido, siempre que el grupo de enlace no interfiera sustancialmente con la capacidad del análogo de EDDP para unirse a un anticuerpo. En algunos ejemplos, la unión del análogo de la EDDP puede ser el resultado de un revestimiento o unión covalente directamente al soporte sólido o a una o más capas de una o más moléculas portadoras tales como poli(aminoácidos) que incluyen proteínas como las albúminas del suero o inmunoglobulinas o polisacáridos(carbohidratos) como, por ejemplo, derivados de dextrano o dextrano. También son posibles otros métodos de unión al análogo de EDDP. Por ejemplo, un soporte  
25 sólido puede tener un recubrimiento de un aglutinante para una molécula pequeña como, por ejemplo, avidina o un anticuerpo, y una molécula pequeña como, por ejemplo, biotina o un hapteno, puede unirse al análogo de EDDP o viceversa.

30 Cuando el soporte es una partícula, el diámetro promedio de la partícula es de al menos aproximadamente 0.02 micrones y no más de aproximadamente 100 micrones. En algunos ejemplos, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0.05 micrones a aproximadamente 20 micrones, o de aproximadamente 0.3 micrones a aproximadamente 10 micrones, por ejemplo. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad de agua aproximada, generalmente de aproximadamente 0.7 g/mL a aproximadamente 1.5 g/mL, y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente, u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, Staphylococcus aureus, E. coli, virus y similares. Las partículas también pueden ser partículas compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas y similares. En algunos ejemplos, las partículas son partículas de cromo o partículas de látex.

40 Los términos "unidades estructurales de poli(aminoácido) no marcadas" y "unidades estructurales de poli(aminoácido) portadores no inmunogénicas" significan poli(aminoácidos) que normalmente no se consideran marcadores o portadores inmunogénicos, aunque dichas unidades estructurales pueden ser marcadores o portadores inmunogénicos en ciertas circunstancias. Por ejemplo, un anticuerpo puede no considerarse una etiqueta, pero puede ser una etiqueta si el anticuerpo se modifica para incluir una unidad estructural que produce una señal o parte de un sistema que produce una señal. Además, un anticuerpo no puede considerarse un portador inmunogénico, pero, sin embargo, es capaz de ser un portador inmunogénico en ciertas circunstancias debido a su mayor peso molecular.

50 La unidad estructural está enlazada a la posición meta de un anillo fenilo de EDDP directamente por un enlace o indirectamente a través de un grupo de enlace. En algunos ejemplos, el grupo de enlace tiene un peso molecular menor que aproximadamente 2000, o menor que aproximadamente 1500, o menor que aproximadamente 1000, o menor que aproximadamente 500, o menor que aproximadamente 300, o menor que aproximadamente 200, o menor que aproximadamente 150, por ejemplo. Dichos grupos de enlace pueden comprender aproximadamente 2 a aproximadamente 200 átomos, o 4 a aproximadamente 150 átomos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 100 átomos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 50 átomos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 25 átomos, sin contar el hidrógeno, y pueden comprender una cadena de 2 a aproximadamente 100 átomos, o 3 a aproximadamente 90 átomos, o aproximadamente 4 a aproximadamente 80 átomos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 70 átomos, o aproximadamente 10 a aproximadamente 50 átomos, o aproximadamente 10 a aproximadamente 25 átomos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos, por ejemplo, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. El número de heteroátomos en tales grupos de enlace depende del tamaño del grupo de enlace y, en algunos ejemplos, el número está en el rango de 0 a aproximadamente 30, o de 1 a aproximadamente 25, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o aproximadamente 2 a aproximadamente 10, o aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o aproximadamente 3 a

aproximadamente 5, por ejemplo. Los heteroátomos pueden estar en forma de una o más funcionalidades, tales como, por ejemplo, éter, éster, amida, urea, carbamato, sulfonamida, tioéter, hidrazona, hidrazida, amidina y éster de fosfato. En un ejemplo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el grupo de enlace comprende dos átomos de nitrógeno y dos grupos carbonilo en una cadena de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 átomos incluyendo los átomos de carbono.

En su mayor parte, cuando un grupo de enlace tiene una funcionalidad de enlace (funcionalidad para la reacción con una unidad estructural) tal como, por ejemplo, un grupo no oxocarbonilo que incluye análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, un agente alquilante tal como halo o tosilaalquilo, oxi (hidroxilo o análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona), o una olefina activa como una vinil sulfona o un éster  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado, estas funcionalidades están enlazadas a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando se unen una amina y un ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se forman amidas, amidinas y fosforamidas. Cuando se unen mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. Cuando se unen un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. Cuando el aldehído y una amina se unen en condiciones reductoras, se forma una alquilamina. Cuando una cetona o un aldehído y una hidroxilamina (incluidos los derivados de la misma donde un sustituyente está en lugar del hidrógeno del grupo hidroxilo) están enlazados, se forma una funcionalidad oxima (= N-O-). Cuando se unen un ácido carboxílico o un ácido fosfato y un alcohol, se forman ésteres. Para otros ejemplos de grupos de enlace, ver, por ejemplo, Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245:3059.

Grupos protectores adecuados incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, t-butildimetilsililo, t-butoxicarbonilo (t-Boc), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetaminometil (Acm), trifenil metilo (Trt), benziloxicarbonilo, bifenilisopropiloxipilácidos, epilácidos de la naturaleza o de los clichés isobornil-oxicarbonilo, alfa-dimetil-3,5-dimetoxibeniloxicarbonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2-ciano-1,1-dimetiletotoxicarbonilo, bromobenciloxi y carbamilo, formilo, por ejemplo. Véase también, por ejemplo, "Principles of Peptide Synthesis" (M. Bodanszky, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984) para un listado de grupos protectores.

## Preparación de Conjugados EDDP

Ejemplos de síntesis de derivados de EDDP meta-sustituídos se describen con referencia a las Figuras 1-7 a modo de ilustración y no de limitación. El compuesto 2-(3-metoxifenil)-2-fenilacetónitrilo (1) se sintetiza haciendo reaccionar bromuro de 3-metoxibenzhidrido con una sal metálica de cianuro tal como, por ejemplo, cianuro de sodio o cianuro de potasio, en presencia de un catalizador de transferencia de fase tal como, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetiltrimetilamonio o bromuro de tetrabutilamonio. La reacción se lleva a cabo en un medio acuoso que contiene aproximadamente 5 a aproximadamente 50% (en volumen) de un disolvente aromático tal como, por ejemplo, tolueno, xileno o benceno. La temperatura durante la reacción es de aproximadamente 40 a aproximadamente 115°C, o aproximadamente 70°C, durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 1.5 horas.

Una cadena de alquilo que contiene un grupo N-metilo se inserta en 1 mediante sustitución nucleófila con cloruro de 2-dimetilaminoisopropilo en condiciones de reacción muy suaves en presencia de un éter de corona como catalizador, lo que da como resultado un aumento del 20% en el porcentaje del isómero deseado (4-dimetilamino)-2-3-(metoxifenil)-2-fenilacetónitrilo (2). La reacción se lleva a cabo en un medio acuoso que contiene aproximadamente 5 a aproximadamente 50% (en volumen) de un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) o dimetilacetamida. La temperatura durante la reacción es de aproximadamente 25 a aproximadamente 75°C, o aproximadamente 45°C, y la reacción se lleva a cabo durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 2 horas.

La N-desmetilación de 2 se realiza por reacción de 2 con cloroformiato de tricloroetilo para obtener 2,2,2-tricloroetil 4-ciano-4-(3-metoxifenil)-4-fenilbutan-2-il(metil)carbamato (3). La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico aromático tal como, por ejemplo, tolueno, xileno o benceno. La temperatura durante la reacción es de aproximadamente 70 a aproximadamente 130°C, o aproximadamente 115°C, y la duración de la reacción es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 3 horas.

La ciclación intramolecular catalizada por ácido cítrico de 3 da 3-(3-metoxifenil)-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-2-imina (4) con un anillo de cinco miembros requerido para el reconocimiento de la EDDP en un inmunoensayo. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida, dimetilsulfóxido y dimetilacetamida acetona. La temperatura durante la reacción es de aproximadamente -5 a aproximadamente 25°C, o aproximadamente 0°C, durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 16 horas, o aproximadamente 3 horas, y a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 35°C, o aproximadamente 25°C, durante un período de aproximadamente 0.5 horas a aproximadamente 16 horas, o alrededor de 1 hora.

El grupo imina en 4 se hidroliza por generación in situ de ácido nitroso para obtener 3-(3-metoxifenil)-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-2-ona (5). La reacción se lleva a cabo en un ácido mineral concentrado tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido nitroso, en presencia de una sal metálica de nitrito, tal como, por ejemplo, nitrito de sodio o nitrito de potasio. La temperatura durante la reacción es de aproximadamente 0 a aproximadamente 120°C.

o aproximadamente 100°C, y la reacción se lleva a cabo durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 1.5 horas.

5 El grupo metoxi en la posición meta de 5 es desprotegido por reacción de 5 con tribromuro de boro para obtener 3-(3-hidroxifenil)-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-2-ona (6). La reacción se lleva a cabo en presencia de un halogenuro metálico como agente de desmetilación tal como, por ejemplo, tribromuro de boro o tricloruro de boro. El solvente para la reacción es un solvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, cloroformo o THF. La temperatura durante la reacción es de aproximadamente -80 a aproximadamente 25°C, o aproximadamente -60°C, y la reacción se lleva a cabo durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 16 horas, o aproximadamente 6 horas.

10 El grupo fenólico libre -OH en 6 se vuelve a proteger con un grupo protector tal como, por ejemplo, grupo t-butildimetilsililo, trimetilsililo o bencilo para obtener 3-(3-(t-butildimetilsililo)fenil)-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-2-ona (7). La reacción se lleva a cabo en presencia de un haluro de t-butildimetilsililo tal como, por ejemplo, cloruro o bromuro. El solvente para la reacción es un solvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, THF, o acetona. La temperatura durante la reacción es de aproximadamente 0 a aproximadamente 70°C, o aproximadamente 25°C, y la reacción se lleva a cabo durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 24 horas.

20 El grupo carbonilo en 7 se convierte en un grupo etilideno por reacción de 7 con un alquil (1 a 5 átomos de carbono) de litio tal como, por ejemplo, etil litio, propil litio o butil litio, para obtener 3-(3-(t-butildimetilsililo)fenil)-2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidina (8). La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico aromático tal como, por ejemplo, tolueno, xileno o benceno. La reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente -15 a aproximadamente 25°C, o aproximadamente -5°C, durante un período de aproximadamente 0.5 horas a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 1 hora, y luego a una temperatura de aproximadamente 15 a aproximadamente 60°C, o aproximadamente 25°C, durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 3 horas.

25 El grupo fenólico-OH se desprotege con hidrólisis ácida suave para obtener 3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenol (9). La reacción de hidrólisis se lleva a cabo utilizando un ácido mineral concentrado como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido nítrico, en un disolvente orgánico polar como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol, etanol). La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 100°C, o aproximadamente a 25°C, durante un periodo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas, o aproximadamente a 24 horas.

30 El bromoacetato de t-butilo se hace reaccionar con el grupo fenólico -OH libre de 9 para obtener 2-(3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acetato de t-butilo (10). La reacción se lleva a cabo en presencia de un hidróxido de metal alcalino tal como, por ejemplo, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio o hidróxido de litio, en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, DMSO, DMF o dimetilacetamida. La reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 15 a aproximadamente 60°C, o aproximadamente a 25°C, durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 3 horas.

40 La hidrólisis ácida de 10 elimina el grupo t-butilo para dar ácido 2-(3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acético (11) con un grupo carboxilo libre. La reacción se lleva a cabo en presencia de un ácido orgánico fuerte tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético o ácido tricloroacético, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, cloroformo o THF. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 60°C, o aproximadamente a 25°C, durante un período de aproximadamente 0.5 horas a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 hora.

45 La N-boc-etilendiamina reacciona con el grupo carboxilo en 11 para obtener 2-(2-(3-(2(etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acetamido)etilcarbamato de t-butilo (12). La reacción se lleva a cabo en presencia de uno o más agentes de acoplamiento peptídicos como, por ejemplo, O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU), 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uranio hexafluorofosfato (HATU), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxotripirrolidinofosfonium (PyBOP) y tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), y N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y mezclas de los mismos en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, acetonitrilo, THF, DMF o DMSO. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 60°C, o aproximadamente a 25°C, durante un período de aproximadamente 0.5 horas a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 hora.

55 El grupo N-boc en 12 se eliminó por reacción de 12 con ácido trifluoroacético para obtener N-(2-aminoetil)-2-(3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acetamida 2,2,2-trifluoroacetato (13) con un grupo amina libre. La reacción se lleva a cabo en presencia de un ácido orgánico fuerte tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético o ácido tricloroacético, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, THF o cloroformo. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 15 a aproximadamente 60°C, o aproximadamente a 25°C, durante un período de aproximadamente 0.5 horas a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 hora.

La eliminación de grupos protectores en la síntesis anterior depende de la naturaleza del grupo protector, por ejemplo. El agente de desprotección puede ser un agente ácido tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético y agua, o un agente básico tal como, por ejemplo, piperidina y DMF. Las condiciones tales como disolventes, temperatura, pH y duración del tratamiento, por ejemplo, dependen de la naturaleza del grupo protector, por ejemplo.

- 5 El grupo amina en 13 se convierte en un grupo bromoacetamido reactivo con tiol para obtener 2-bromo-N-(2-(2-(3-(2-  
etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acetamido)etil)acetamida (14) por reacción de 13 con N-  
hidroxisuccinimidil éster de ácido 2-bromoacético. La reacción se lleva a cabo en presencia de una base tal como, por  
ejemplo, DIPEA o trietilamina, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, diclorometano, cloroformo o THF. La  
reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 15 a aproximadamente 60°C, o aproximadamente a  
10 25°C, durante un período de aproximadamente 0.5 horas a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 hora.

- Un ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, de una conjugación del compuesto 14 con una unidad estructural  
está representado por la síntesis del conjugado EDDP G6PDH-14 (15). La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (mutante  
3K de G6PDH con dos residuos de cisteína por enzima) se hace reaccionar con 14 para obtener G6PDH-14 EDDP  
conjugado como sigue. El G6PDH activado se disuelve en un regulador acuoso tal como, por ejemplo, regulador  
15 fosfato, regulador acetato o regulador borato, que contiene un agente quelante tal como, por ejemplo,  
etilendiaminetetraacetato (EDTA), en presencia de un agente reductor como, por ejemplo, ditiotreitól, cisteína o  
mercaptoetanol, a un pH de aproximadamente 6 a 8, o aproximadamente 7.2. A esta solución se añade reactivo de  
tiol 14 disuelto en un solvente orgánico polar tal como, por ejemplo, DMF, DMSO o dimetilacetamida. La reacción se  
lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 25°C, o aproximadamente a 4°C, durante  
20 un periodo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 36 horas, o aproximadamente a 24 horas. El conjugado  
EDDP G6PDH-14 se purifica por cromatografía tal como, por ejemplo, cromatografía de filtración en gel o  
cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

#### Preparación de Anticuerpos con Conjugados de EDDP Inmunogénicos

- 25 Los conjugados de 14 con unidades estructurales de etiqueta de poli(aminoácido), unidades estructurales de etiqueta  
no-poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de poli(aminoácido), los vehículos inmunogénicos no-  
poli(aminoácidos) se pueden sintetizar de una manera similar a la descrita anteriormente para el conjugado EDDP  
G6PDH-14.

- Se pueden emplear ejemplos de conjugados EDDP portadores inmunogénicos de acuerdo con los principios descritos  
en el presente documento para preparar anticuerpos específicos para EDDP. Mediante la expresión "anticuerpo o  
30 anticuerpos específicos para EDDP" se entiende un anticuerpo que se une específicamente a EDDP y no se une en  
ningún grado significativo a otras entidades, de manera que el análisis para EDDP se distorsionaría.

- Los anticuerpos específicos para EDDP para uso en inmunoensayos pueden ser monoclonales o policlonales. Dichos  
anticuerpos pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en el arte, como la inmunización de un  
huésped y la recolección de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recolectando la  
35 proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de  
los mismos que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos  
naturales.

- Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o intacta o fragmentos de la misma, cuyas  
inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG2, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Sus  
40 fragmentos pueden incluir Fab, Fv y F(ab')<sub>2</sub>, Fab', y similares. Cuando la IgG se digiere enzimáticamente, se obtienen  
diferentes fragmentos dependiendo de la enzima utilizada; por ejemplo, si se usa papaína, se obtienen tres fragmentos,  
el fragmento que contiene carbohidratos (Fc) y dos fragmentos de unión a antígeno (Fab) y, si se usa pepsina, se  
obtiene un fragmento de F(ab')<sub>2</sub>, mientras que el fragmento que contiene carbohidratos es digerido. Lo anterior se  
debe al hecho de que la papaína corta las cadenas pesadas inmediatamente después de la región bisagra (hacia la  
45 región amino terminal), mientras que la pepsina las corta antes de la bisagra (hacia la región del terminal carboxi).  
Cuando se trata con un reactivo capaz de reducir los enlaces disulfuro, el fragmento F(ab')<sub>2</sub> se divide en dos  
fragmentos, llamados Fab', que tienen las mismas propiedades inmunológicas que los fragmentos Fab producidos por  
la digestión con papaína. Además de anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos, se pueden usar agregados,  
polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o de sus fragmentos cuando sea apropiado, siempre que se mantenga  
50 la afinidad de unión a una molécula particular.

- El antisuero que contiene anticuerpos (policlonales) se obtiene mediante técnicas bien establecidas que involucran la  
inmunización de un animal, como conejo, oveja, caballo, pollo, cobaya, cabra o similares con un inmunógeno  
apropiado y obteniendo antisueros de la sangre del animal inmunizado tras un período de espera adecuado. Las  
revisiones más recientes son proporcionadas por Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds,  
55 Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., U.S., 1976), Butler, J. Immunol. Meth. 7: 1-24 (1975); Broughton and Strong,  
Clin. Chem. 22: 726-732 (1976); y Playfair, et al., Br. Med. Bull. 30: 24-31 (1974).

Los anticuerpos también pueden obtenerse mediante técnicas de hibridación de células somáticas, denominándose a  
dichos anticuerpos comúnmente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse de

acuerdo con las técnicas estándar de Kohler y Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975. Las revisiones de las técnicas de anticuerpos monoclonales se encuentran en *Lymphocyte Hybridomas*, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (New York 1978), *Nature* 266: 495 (1977), *Science* 208: 692 (1980), y *Methods of Enzymology* 73 (Part B): 3-46 (1981). En otra metodología para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica los sitios de unión de anticuerpos puede escindirse del ADN del cromosoma e insertarse en un vector de clonación, que puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los correspondientes sitios de unión de anticuerpos.

Descripción general de ensayos para EDDP que utilizan los compuestos presentes

Los ejemplos de anticuerpos específicos para EDDP preparados a partir de conjugados de EDDP inmunogénicos de acuerdo con los principios descritos en este documento pueden emplearse en ensayos para la determinación de EDDP en una muestra. Los ejemplos de conjugados marcados de acuerdo con los principios descritos en el presente documento pueden emplearse como reactivos marcados en ensayos para la determinación de EDDP en una muestra.

Un ensayo se puede realizar sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los ensayos heterogéneos generalmente implican uno o más pasos de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que involucran reactivos no marcados generalmente comprenden la formación de complejos relativamente grandes que involucran uno o más anticuerpos preparados a partir de conjugados inmunogénicos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas correspondientes de dispersión de la luz tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos. Los inmunoensayos marcados incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayos de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo, un anticuerpo contra un inmunógeno de acuerdo con los principios descrito en el presente documento comprende un marcador y/o un conjugado de marcado de acuerdo con los principios descritos en el presente documento se emplea en el ensayo.

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos que utilizan una concentración limitada del presente reactivo conjugado. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales, tales como, por ejemplo, un exceso del reactivo conjugado presente. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos sin separación en los cuales un reactivo marcado de acuerdo con los principios descritos en este documento modula la señal del marcador al unirse el conjugado presente a EDDP en la muestra.

Como se mencionó anteriormente, los ensayos pueden realizarse sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) descrito en Rubenstein, et al., Patente de Estados Unidos No. 3,817,837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los descritos en Ullman, et al., Patente de Estados Unidos No. 3,996,345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") como los descritos en Maggio et al., Patente de Estados Unidos No. 4,233,402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se describe, por ejemplo, en, entre otros, la Patente de Estados Unidos No. 5,354,693; e inmunoensayos enzimáticos como el inmunoensayo enzimático ("ELISA"). Ejemplos de ensayos heterogéneos son los radioinmunoensayos, descritos en Yalow, et al., *J. Clin. Invest.* 39:1157 (1960).

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por un módulo enzimático ("EMMIA") discutido por Ngo y Lenhoff, *FEBS Lett.* (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia marcado con sustrato ("SLFIA") descrito por Oellerich, *J. Clin. Chem. Clinica Biochem.* (1984) 22:895-904; los inmunoensayos de donantes de enzimas combinados ("CEDIA") descritos por Khanna, et al., *Clin. Chem. Acta* (1989) 185:231-240; inmunoensayos homogéneos marcados con partículas, tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica potenciada por partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas ("PETIA"), etc.; y similares.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de membrana enzimática ("EMIA"); luminoinmunoensayos ("LIA"); etcétera. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que involucran la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas del presente conjugado en la unión del analito EDDP. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores semiconductores, ensayos de inmunosensores de transductores electroquímicos, ensayos de inmunosensores potenciométricos, ensayos de electrodos amperométricos.

Los ensayos heterogéneos generalmente implican uno o más pasos de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Una variedad de formatos de ensayos heterogéneos competitivos y no competitivos se describen en Davalian, et al., Patente de Estados Unidos No. 5,089,390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un ejemplo de un ensayo heterogéneo competitivo, un soporte que tiene un anticuerpo para EDDP unido al mismo se pone en contacto con un medio que contiene la muestra sospechosa de contener EDDP y un EDDP marcado conjugado de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. La EDDP en la muestra compite con el conjugado de la EDDP que lleva la etiqueta detectable para unirse al anticuerpo de la EDDP. Después de separar el soporte y el

medio, la actividad de la etiqueta del soporte o el medio se determina mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de analito EDDP en la muestra.

5 El soporte puede comprender un material insoluble en agua, orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de varias formas, tales como una partícula (soporte en partículas) que incluye una perla, una película, una membrana, un tubo, un pozo, una tira, una barra y superficies planas como, por ejemplo, una placa, papel, etc., fibra, por ejemplo. El soporte puede o no ser suspendible en el medio en donde se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles, y partículas magnéticas, por ejemplo. 10 Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), poliestireno, poli(etil butirato), etc.; ya sea por sí mismos o en conjunto con otros materiales.

15 En algunos ejemplos de ensayos, el soporte puede ser una partícula. Las partículas tienen un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0.02 micrones y no más de aproximadamente 100 micrones. En algunos ejemplos, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0.05 micrones a aproximadamente 20 micrones, o de aproximadamente 0.3 micrones a aproximadamente 10 micrones. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad de agua aproximada, generalmente de aproximadamente 0.7 g/mL a aproximadamente 1.5 g/mL, y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente, u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, Staphylococcus aureus y 20 virus de E. coli, por ejemplo. Las partículas también pueden ser partículas compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas y similares. En algunos ejemplos, las partículas son partículas de dióxido de cromo (cromo) o partículas de látex.

25 En algunos ejemplos, una muestra por analizar se combina en un medio de ensayo con un anticuerpo para EDDP y EDDP marcado. El anticuerpo puede ser un anticuerpo generado contra un conjugado inmunogénico de acuerdo con los principios descritos en este documento o generado contra otro conjugado de EDDP. La EDDP marcada puede ser un conjugado etiquetado de acuerdo con los principios descritos en este documento u otro conjugado EDDP etiquetado. El medio se examina para determinar la presencia y la cantidad de un complejo que comprende EDDP y el anticuerpo para EDDP, donde la presencia y/o la cantidad de dicho complejo indica la presencia y/o cantidad de 30 EDDP en la muestra.

La muestra por analizar es una de la que se sospecha que contiene EDDP. Las muestras son preferiblemente de un sujeto mamífero, por ejemplo, seres humanos u otras especies animales e incluyen fluidos biológicos como sangre entera, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, fluido espinal, saliva, excrementos, 35 líquido cerebrospinal, lágrimas, moco y similares; tejido biológico, como cabello, piel, cortes o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; etcétera. En muchos casos, la muestra es sangre entera, plasma o suero.

La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente. Convenientemente, la muestra puede prepararse en un medio de ensayo, que se describe más detalladamente a continuación. En algunos casos, se puede aplicar un tratamiento previo a la muestra como, por ejemplo, para someter a lisis células sanguíneas. En algunos ejemplos, dicho tratamiento previo se realiza en un medio que no interfiere posteriormente con un ensayo.

40 Los ensayos normalmente se llevan a cabo en un medio acuoso regulado a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir de 0.1 a aproximadamente 40 por ciento en volumen de un cosolvente. El pH para el medio estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.5. El pH generalmente será un compromiso entre la unión 45 óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específica, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, como los miembros del sistema productor de señal, y así sucesivamente. Se pueden usar diversos reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE, y similares. El regulador particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro regulador.

50 Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de los reguladores, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos tales como dextrano, trehalosa o similares. El medio también puede 55 comprender agentes para prevenir la formación de coágulos de sangre. Tales agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, citrato, heparina y similares. El medio también puede comprender uno o más conservantes como se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomycin y similares. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplea, está presente en una concentración o cantidad suficiente para lograr el efecto o función deseados.

Como se mencionó anteriormente, la muestra y el reactivo de anticuerpo y el reactivo de EDDP marcado se combinan en el medio de ensayo. Dependiendo de la naturaleza del ensayo empleado, el medio o uno o ambos de los reactivos anteriores pueden comprender uno o más componentes como, por ejemplo, un soporte sólido (por ejemplo, una partícula) y otros miembros de un sistema productor de señales del cual la etiqueta es una parte, por ejemplo.

- 5 Se pueden aplicar uno o más períodos de incubación al medio en uno o más intervalos, incluidos los intervalos entre las adiciones de varios reactivos empleados en un ensayo que incluyen los mencionados anteriormente. El medio generalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzcan la unión de varios componentes de los reactivos y la unión de EDDP en la muestra. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y, generalmente, temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el período de la medición. En algunos ejemplos, las temperaturas de incubación varían de aproximadamente 5° a aproximadamente 99°C, o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C. El período de tiempo para la incubación, en algunos ejemplos, es de aproximadamente 0.2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 15 minutos. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos, que está determinada por la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación.

- 20 En un ejemplo de un método para determinar EDDP en una muestra sospechosa de contener EDDP, se proporciona una combinación en un medio donde la combinación incluye la muestra, un anticuerpo para EDDP y un compuesto EDDP marcado de acuerdo con los principios descritos aquí donde etiqueta es una etiqueta de poli(aminoácido) o una etiqueta de no-poli(aminoácido). El anticuerpo para EDDP puede ser un anticuerpo generado contra un conjugado inmunógeno de EDDP de acuerdo con los principios descritos en este documento. Sin embargo, para este ejemplo, el anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo específico para EDDP. El medio se examina para determinar la presencia y la cantidad de un complejo que comprende EDDP y el anticuerpo para EDDP. La presencia y/o la cantidad del complejo indica la presencia y/o cantidad de EDDP en la muestra.

- 30 En otro ejemplo de un método para determinar EDDP en una muestra sospechosa de contener EDDP, la muestra sospechosa de contener EDDP se combina en un medio con un anticuerpo generado contra un conjugado inmunógeno de EDDP de acuerdo con los principios descritos en este documento y con un conjugado marcado de ser un anticuerpo generado contra un conjugado inmunógeno de EDDP de acuerdo con los principios descritos en este documento. El conjugado de etiqueta de EDDP puede estar de acuerdo con los principios descritos en este documento o el conjugado de etiqueta puede ser cualquier conjugado marcado de EDDP. El medio se examina en busca de la presencia y/o cantidad de un complejo que comprende EDDP y el anticuerpo y la presencia y/o cantidad del complejo indica la presencia de EDDP en la muestra.

- 35 Algunos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señales (sps) que emplea primero y segundo miembros sps. La designación "primero" y "segundo" es completamente arbitraria y no pretende sugerir ningún orden o clasificación entre los miembros del SPS ni ningún orden de adición de los miembros de sps en los métodos actuales. Los miembros de sps pueden estar relacionados en cuanto la activación de un miembro de los sps produce un producto tal como, por ejemplo, luz, lo que da como resultado la activación de otro miembro de los sps.

- 40 En algunas realizaciones de ensayos conocidos, los miembros de sps comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición quimioluminiscente en la que la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo miembro de sps generalmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de miembro de sps unido y/o no enlazado, es decir, la cantidad de miembro de sps unido o no enlazado al analito de EDDP que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad de analito EDDP por detectar. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, uno de los reactivos sensibilizadores o los reactivos quimioluminiscentes comprende el presente reactivo conjugado. Ejemplos de fotosensibilizadores y reactivos quimioluminiscentes que pueden utilizarse son los que se exponen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,340,716 y 6,251,581.

- 50 En un ejemplo particular, se puede emplear un inmunoensayo de luminiscencia inducida. El inmunoensayo de luminiscencia inducida se menciona en la Patente de Estados Unidos No. 5,340,716 (Ullman). En una metodología, el ensayo usa una partícula que se ha asociado con un fotosensibilizador en donde un conjugado de EDDP de acuerdo con los principios descritos en el presente documento está unido a la partícula. El reactivo quimioluminiscente comprende un anticuerpo para la EDDP. El analito EDDP compete con EDDP unido a partículas para el anticuerpo para EDDP. Si el analito EDDP está presente, menor es el número de moléculas de conjugado fotosensibilizador-EDDP que se acercan al compuesto quimioluminiscente. Por lo tanto, habrá una disminución en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando las dos etiquetas están muy cerca. El reactivo quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida se relaciona con la cantidad del complejo formado, que a su vez se relaciona con la cantidad de analito EDDP presente en la muestra.

- 60 En un ejemplo del ensayo de luminiscencia inducida, se emplea una partícula fotosensibilizadora que se conjuga con avidina o estreptavidina. También se emplea un conjugado de EDDP y biotina cuando el conjugado está de acuerdo

con los principios descritos en este documento. Como parte del sistema de detección, se emplea un reactivo quimioluminiscente que comprende un asociado de unión para la EDDP. El medio de reacción se incubaba para permitir que la avidina o la estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se unan al conjugado de biotina-EDDP en virtud de la unión entre la avidina y la biotina y también para permitir que el asociado de unión para el analito de la EDDP forme parte del reactivo quimioluminiscente para unirse al analito EDDP o al conjugado EDDP en las partículas fotosensibilizadoras. Luego, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que menos reactivo quimioluminiscente está ahora cerca del fotosensibilizador debido a la presencia del analito EDDP, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y emite luminiscencia. Luego se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, y su presencia está relacionada con la presencia y/o cantidad del analito EDDP donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito EDDP.

La concentración del analito EDDP que puede ensayarse generalmente varía de aproximadamente  $10^{-5}$  a aproximadamente  $10^{-17}$  M, más generalmente de aproximadamente  $10^{-6}$  a aproximadamente  $10^{-14}$  M. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (en relación con la cantidad del analito EDDP presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración esperada del analito EDDP normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán por el rango de concentración de interés del analito EDDP, la naturaleza del ensayo y similares. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo en el rango de interés. Es decir, una variación en la concentración del analito EDDP que es importante debe proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema que produce la señal y la naturaleza de los analitos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Como se mencionó anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Si bien el orden de adición al medio puede variar, habrá ciertas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo descritos en este documento. El orden de adición más simple, por supuesto, es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, se pueden combinar secuencialmente. En algunas realizaciones, una etapa de incubación puede estar implicada después de cada adición como se discutió anteriormente. En ensayos heterogéneos, los pasos de lavado también pueden emplearse después de uno o más pasos de incubación.

#### Etapa de examen

En una siguiente etapa de un método de ensayo, el medio se examina para detectar la presencia de un complejo que comprende el analito EDDP y el anticuerpo para EDDP. La presencia y/o cantidad del complejo indica la presencia y/o cantidad del analito EDDP en la muestra.

La expresión "medir la cantidad de un analito EDDP" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa de EDDP. Los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como todos los demás métodos para determinar el analito de EDDP, se consideran métodos para medir la cantidad del analito de EDDP. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito EDDP en una muestra sospechosa de contener el analito EDDP, se considera que está incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para medir, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. La presencia y/o cantidad de la señal está relacionada con la presencia y/o cantidad del analito EDDP en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza de los sps. Como se mencionó anteriormente, existen numerosos métodos mediante los cuales una etiqueta de un sps puede producir una señal detectable por medios externos. La activación de un sistema productor de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema que producen señales.

Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente  $10^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $70^{\circ}\text{C}$  o de aproximadamente  $20^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$ , o de aproximadamente  $20^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ . En un enfoque, se forman curvas estándar utilizando concentraciones conocidas del analito EDDP. También se pueden usar calibradores y otros controles.

La luminiscencia o la luz producida a partir de cualquier etiqueta se puede medir de forma visual, fotográfica, actinométrica, espectrofotométrica, tal como utilizando un fotomultiplicador o un fotodiodo, o por cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad de la misma, que se relaciona con la cantidad de analito EDDP en el médium. El examen de la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente un paso en donde se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser, entre otros, un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro y un quimioluminómetro, por ejemplo.

Kits que comprenden reactivos para la realización de ensayos.

Los conjugados EDDP marcados de acuerdo con los principios descritos en este documento o los anticuerpos para EDDP generados contra los conjugados EDDP inmunogénicos de acuerdo con los principios descritos en este documento y otros reactivos para realizar un ensayo particular para el analito EDDP pueden estar presentes en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para La determinación de un analito EDDP. En algunas realizaciones, un kit comprende en combinación empaquetada un asociado de unión a biotina tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina, asociada con una partícula, conjugado de EDDP biotinilado de acuerdo con los principios descritos en este documento y un anticuerpo marcado con enzimas para el analito de EDDP. El kit puede incluir además otros reactivos para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular.

Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o se pueden combinar varios reactivos en uno o más recipientes, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empaquetados por separado para realizar un ensayo, como miembros sbp adicionales, miembros sps, reactivos auxiliares, por ejemplo.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que deben ocurrir durante los presentes métodos y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, generalmente liofilizado, incluidos los excipientes, que por disolución proporcionará una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo utilizando un conjugado de EDDP de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método que utiliza reactivos que incluyen un conjugado de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La expresión "al menos" como se usa en este documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número citado. La expresión "aproximadamente" como se usa en este documento significa que el número citado puede diferir en más o menos 10%; por ejemplo, "alrededor de 5" significa un rango de 4.5 a 5.5. Las designaciones "primero" y "segundo" se usan únicamente con el fin de diferenciar entre dos elementos como, por ejemplo, "primer miembro de sps" y "segundo miembro de sps", y no pretenden implicar ninguna secuencia u orden o importancia para un elemento sobre otro.

La siguiente discusión está dirigida a ejemplos específicos de acuerdo con los principios descritos aquí a modo de ilustración y no de limitación; los ejemplos específicos no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas. Pueden idearse numerosas modificaciones y composiciones, métodos y sistemas alternativos sin apartarse del espíritu y alcance de la presente divulgación.

### Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, los materiales en los experimentos a continuación se pueden adquirir en Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis MO. Los derivados de aminoácidos para la síntesis de péptidos se pueden adquirir en EMD Chemicals, Gibbstown NJ. El éster Biotin-dPEG4-NHS se puede adquirir en Quanta Biodesign, Powell OH. Las partes y porcentajes descritos aquí son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Definiciones:

hora = hora(s)

rpm = revoluciones por minuto

mg = miligramo

g = gramo(s)

mL = mililitro(s)

°C = grados centígrados

min = minuto(s)

concentrado = concentrado

NHS = N-hidroxisuccinimida

DTT = ditiotreitól

kDa = kilodalton(s)

mAu = miliunidad de absorbancia

Preparación de compuestos EDDP meta-sustituidos:

## Paso 1: 2-(3-metoxifenil)-2-fenilacetónitrilo

Se disolvió 3-metoxibenzhidrol (200 g) en tolueno (2000 mL). A esta solución se añadió bromuro de calcio anhidro (200 g). Se burbujeó gas bromuro de hidrógeno a través de la mezcla de reacción durante 2 horas a 25°C con agitación. La mezcla de reacción se filtró y se transfirió a otro matraz y el gas argón se purgó a través del matraz durante 1 hora.

- 5 Se añadió bromuro de cetiltrimetilamonio (6g) a la solución en tolueno de bromuro de 3-metoxibenzhidrolo preparado como se indicó anteriormente. La solución de tolueno se calentó a 70°C y se añadió a la solución cianuro de sodio (50g) disuelto en agua (500 mL) y se precalentó a 70°C. La mezcla de reacción se agitó a 70°C durante 1.5 horas a 800 rpm. Luego, la mezcla de reacción se enfrió a 25°C y se extrajo con acetato de etilo (2000 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a vacío a 37°C. Se obtuvo un líquido viscoso marrón oscuro (160 g) como producto crudo.

- 10 La purificación del producto crudo se llevó a cabo en un sistema de cromatografía instantánea BIOTAGE® AB ISOLERA™ (Charlotte NC) de la siguiente manera: el producto crudo (80 g) se disolvió en acetato de etilo (80 mL) y se cargó en el cartucho SNAP del sistema de cromatografía que contenía 1500 g de gel de sílice. El producto se eluyó con un gradiente escalonado de acetato de etilo y hexano. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron a vacío para obtener un líquido amarillo viscoso. Rendimiento del producto purificado (procesos combinados): 40g. 1H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 3.7 δ (3H, -OCH<sub>3</sub>), 5.1 δ (1H, -CH-CN), 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo), Espectrometría de masas: m/z = 141 (M+H<sub>2</sub>O)

## Etapa 2: 4-(dimetilamino)-2-(3-metoxifenil)-2-fenilpentanonitrilo

- 20 El producto de la Etapa 1 (60g) se disolvió en dimetilsulfóxido (60 mL). A este, se añadió dibenzo-18-coro-6 (2.25 g) seguido de la adición de una solución de hidróxido de sodio (45 g) disuelto en agua (50 mL), que se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 25°C. A este, se añadió clorhidrato de 2-dimetilacinoisopropilo en pequeñas porciones. La adición se completó en 10 minutos y la temperatura de la mezcla de reacción aumentó a 45°C. La mezcla de reacción que contenía el matraz se sumergió luego en un baño de aceite precalentado a 45°C. La agitación se continuó a 45°C durante 2 horas. Luego, la mezcla de reacción se diluyó con cloroformo (2000 mL) y se extrajo dos veces con 500 mL de agua cada una. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró para obtener un líquido amarillo viscoso que contenía regioisómeros del producto.

- 25 El isómero deseado de la Etapa 2 se separó en el sistema de cromatografía instantánea BIOTAGE® AB ISOLERA™ de la siguiente manera: El producto crudo (15 g) se cargó en un cartucho SNAP que contenía 340 g de gel de sílice. La columna se eluyó con un gradiente de acetona y hexano. El isómero deseado del paso 2 se eluyó en último lugar. Rendimiento del producto purificado (procesos combinados): 38g. 1H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 0.9 δ (3H, -CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 2.1 δ (6H, -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.3 δ (1H, -CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 2.6 y 2.8 δ (1H, 1H, -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 3.8 δ (3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo). Espectrometría de masas: m/z = 309 (M+H)

## Etapa 3: 2,2,2-tricloroetil 4-ciano-4-(3-metoxifenil)-4-fenilbutan-2-il(metil)carbamato

- 35 El producto de la Etapa 2 (38 g) se disolvió en tolueno (400 mL). A este, se añadió cloroformiato de 2,2,2-tricloroetil (90 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo bajo purga con argón durante 3 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar a 25°C y se concentró a vacío para dar 200 g de material crudo. La purificación se realizó de la siguiente manera en el sistema de cromatografía instantánea BIOTAGE® AB ISOLERA™. El producto crudo (50 g) se cargó en un cartucho SNAP que contenía 340 g de gel de sílice y se eluyó utilizando un gradiente de acetona y hexano. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron al vacío. Rendimiento del producto purificado (procesos combinados): 42 g. 1H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 1.2 δ (3H, -CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 2.8 δ (6H, -N-(CH<sub>3</sub>)), 2.5, 2.6, 3.1 δ (1H, 1H, 1H -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 3.8 δ (3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo). Espectrometría de masas: m/z = 469 (M+H), 486 (M+ H<sub>2</sub>O)

## Etapa 4: 3-(3-metoxifenil)-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-2-imina

- 45 El producto de la Etapa 3 (40 g) se disolvió en tetrahidrofurano (500 mL). La solución se enfrió a 0°C usando un baño de hielo y se agitó bajo argón durante 30 min. Luego, se agregaron 60 g de polvo de cinc seguido de 60 mL de ácido fórmico (90%) a las mezclas de reacción y se continuó la agitación a 0°C durante 3 horas bajo purgado con argón. La agitación se continuó a 25°C durante 16 horas bajo purga con argón. A continuación, la mezcla de reacción se filtró y se concentró a vacío. El producto crudo de la Etapa 4 se llevó a cabo sin purificación.

## Etapa 5: 3-(3-metoxifenil)-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-2-ona

- 50 El producto de la Etapa 4 (20g) se añadió a ácido clorhídrico 5N y la mezcla de reacción se sometió a reflujo bajo purga de argón. A esta mezcla se agregaron en porciones 160 g de nitrito de sodio disuelto en agua (200 mL). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 30 minutos más y se enfrió a 25°C y se extrajo con cloroformo (2000 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y luego se concentró a vacío para obtener un producto crudo de color marrón oscuro de la Etapa 5 (12g). El producto crudo se purificó en el sistema de cromatografía instantánea BIOTAGE® AB ISOLERA™ de la siguiente manera: el producto crudo se disolvió en cloroformo (10 mL) y se cargó en un cartucho SNAP que contenía 340 g de gel de sílice. La columna se eluyó con un gradiente de acetato de etilo y hexano. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron a vacío para obtener un

aceite amarillo viscoso (21 g). 1H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 1.2 δ (3H, -CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 2.8 δ (3H, -N-(CH<sub>3</sub>)), 2.2, 3.1, 3.5 δ (1H, 1H, 1H -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 3.8 δ (3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo). Espectrometría de masas: m/z = 296 (M+H).

Etapa 6: 3-(3-hidroxifenil)-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-2-ona

- 5 El producto de la Etapa 5 (5g) se disolvió en diclorometano (250 mL) y se agitó a -60°C en una purga con argón usando hielo seco y acetona. Después de 30 min a -60°C y bajo purga con argón, se añadió gota a gota tribromuro de boro 1 M en diclorometano (45 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a -60°C con purga de argón. Luego, la mezcla de reacción se dejó calentar a 25°C y se agitó bajo argón durante 2 horas a 25°C. La reacción se detuvo con la adición lenta de metanol (50 mL) a 4°C. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se vertió en HCl 1N frío (300 mL). El precipitado blanco se extrajo con diclorometano (500 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El producto crudo se usó sin purificación adicional.

Etapa 7: 3-(3-(tert-butildimetilsililoxi)fenil)-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-2-ona

- 15 El producto de la Etapa 6 (4.9 g) se disolvió en diclorometano (200 mL). A este, se añadió imidazol (5 g) y cloruro de butildimetilsililo terciario (5 g). La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 16 horas. Luego, la mezcla de reacción se extrajo con agua (200 mL) y la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. La capa orgánica se filtró y se concentró a vacío. El producto crudo se cargó en un cartucho SNAP que contenía 340 g de gel de sílice y se eluyó con un gradiente de acetato de etilo y hexano utilizando el sistema de cromatografía instantánea BIOTAGE® AB ISOLERA™. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron para obtener el producto de la Etapa 7 en forma de un aceite viscoso e incoloro. Rendimiento del producto purificado: 2.75 g. 1H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 0.1 δ (6H, -Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.9 δ (9H, (-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> de butilo terciario), 1.3 δ (3H, -CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 2.8 δ (3H, -N-(CH<sub>3</sub>)), 2.25, 3.1, 3.5 δ (1H, 1H, 1H -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo). Espectrometría de masas: m/z = 396 (M+H).

Etapa 8: 3-(3-(tert-butildimetilsililoxi) fenil)-2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidina

- 25 El producto de la Etapa 7 (2.5 g) se disolvió en tolueno (150 mL). La solución se enfrió rodeando el matraz con hielo seco y los contenidos se agitaron bajo purga de argón durante 30 minutos. A esto se añadió una dispersión de etil litio (25 ml, 1.7 M en butil éter). La mezcla de reacción se agitó en hielo seco bajo purga con argón durante 1 hora y se dejó calentar a 25°C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a 25°C con purga de argón. Luego, la mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados y se enfrió a 0°C usando un baño de hielo. La reacción se detuvo mediante la adición lenta de agua (5 mL) a la solución de tolueno en agitación. Una vez que cesó la evolución de los gases, la mezcla de reacción se extrajo con agua (tres veces a 50 mL cada una). La capa orgánica se diluyó con acetato de etilo (500 mL) y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. La capa orgánica se filtró y se concentró a vacío para obtener un producto de la Etapa 8 en forma de un aceite viscoso de color marrón rojizo (3 mL). Espectrometría de masas: m/z = 408 (M+H). El producto se llevó adelante sin purificación adicional.

Etapa 9: 3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenol

- 35 El producto de la Etapa 8 (3 mL) se disolvió en metanol (100 mL). A este, se añadió HCl concentrado al 35% (2.75 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 24 horas. Luego, la mezcla de reacción se evaporó al vacío para obtener una espuma de color rojo anaranjado. La espuma se disolvió en diclorometano (200 mL) y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. La capa orgánica se filtró y se concentró al vacío para obtener el producto de la Etapa 9 en forma de una espuma de color rojo anaranjado (1g). 1H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 0.7 δ (-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 1.7 δ (3H, =CH-CH<sub>3</sub> de etileno) 3.8 δ (3H, -N-(CH<sub>3</sub>)), 2.6, 2.8, 3.1 δ (1H, 1H, 1H -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 4.8 δ (1H, =CH-CH<sub>3</sub> de etileno) 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo). Espectrometría de masas: m/z = 294 (M+H).

Etapa 10: 2-(3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il) fenoxi)acetato de tert-butilo

- 45 El producto de la Etapa 9 (1 g) se disolvió en dimetilsulfóxido (60 mL). A este, se añadieron hidróxido de potasio en polvo (1 g) y bromoacetato de butilo terciario (2.5 mL). La mezcla de reacción se agitó bajo argón durante 3 horas a 25°C. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (800 mL) y se extrajo con agua (dos veces a 200 mL cada una) y cloruro de sodio saturado en agua (200 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a vacío. El producto crudo se cargó en un cartucho SNAP que contenía 100 g de gel de sílice y se eluyó con un gradiente de cloroformo y metanol utilizando el sistema de cromatografía instantánea BIOTAGE® AB ISOLERA™. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron para obtener el producto de la Etapa 10 en forma de un aceite rojo (0.26 g). 1H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 1.3 δ (-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 1.5 δ (-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> de butil terciario) 2.1 δ (3H, =CH-CH<sub>3</sub> de etileno) 2.9 δ (3H, -N-(CH<sub>3</sub>)), 2.8, 3.1, 3.5 δ (1H, 1H, 1H -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 4.4 δ (1H, =CH-CH<sub>3</sub> de etileno), 4.5 (2H, -O-CH<sub>2</sub>-C(O)-) 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo). Espectrometría de masas: m/z = 408 (M+H).

Etapa 11: ácido 2-(3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acético

- 55 El producto de la etapa 10 (0.26 g) se disolvió en diclorometano (10 mL). A este, se añadió ácido trifluoroacético (5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 1 hora. Luego, la mezcla de reacción se evaporó al vacío para

obtener el producto de la Etapa 11 (0.22 g) que se usó sin más purificación. Espectrometría de masas:  $m/z = 352$  (M+H).

Etapa 12: 2-(2-(3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acetamido)etilcarbamato de tert-butilo

- 5 El producto de la Etapa 11 (0.11 g) se disolvió en acetonitrilo (10 mL). A este, se agregaron N-boc-etilendiamina (0.1 g), HBTU (0.4 g), HOBT (0.15 g) y DIPEA (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 1 hora y se evaporó a vacío. El residuo se disolvió en diclorometano (300 mL) y se extrajo con agua (dos veces a 200 mL cada uno). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró y se evaporó. El producto crudo se cargó en un cartucho SNAP que contenía 100 g de gel de sílice y se eluyó con un gradiente de cloroformo y metanol utilizando el sistema de cromatografía instantánea BIOTAGE® AB ISOLERA™. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron a vacío para obtener el Paso 12 (0.13g). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 1.25 δ (-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 1.5 δ (9H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> de N-boc) 1.8 δ (3H, =CH-CH<sub>3</sub> de etilideno) 2.9 δ (3H, -N-(CH<sub>3</sub>)), 2.2, 2.3, 3.1 δ (1H, 1H, 1H -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 3.3, 3.5 δ (2H, 2H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-), 4.4 δ (1H, =CH-CH<sub>3</sub> de etilideno), 4.5 (2H, -O-CH<sub>2</sub>-C(O)-), 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo). Espectrometría de masas:  $m/z = 494$  (M+H).

Etapa 13: N-(2-aminoetil)-2-(3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acetamida 2,2,2-trifluoroacetato

- 15 El producto de la Etapa 12 (0.13 g) se disolvió en diclorometano (10 mL). A este, se añadió ácido trifluoroacético (2.5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se evaporó al vacío para obtener el producto de la Etapa 13 (0.1 g), que se llevó a cabo sin purificación adicional.

Paso 14: 2-bromo-N-(2-(2-(3-(2-etiliden-1,5-dimetil-3-fenilpirrolidin-3-il)fenoxi)acetamido)etil)acetamida

- 20 El producto de la etapa 13 (0.1 g) se disolvió en diclorometano (50 mL). A este, se añadió DIPEA (3 mL) seguido de éster NHS de ácido bromoacético (0.2 g). La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 1 hora bajo argón y se evaporó al vacío. El producto crudo se cargó en un cartucho SNAP que contenía 100 g de gel de sílice y se eluyó con un gradiente de cloroformo y metanol utilizando el sistema de cromatografía instantánea BIOTAGE® AB ISOLERA™. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron para obtener el producto de la Etapa 14 (0.1 g). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 1.3 δ (-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 2.0 δ (3H, =CH-CH<sub>3</sub> de etileno) 2.9 δ (3H, -N-(CH<sub>3</sub>)), 2.2, 2.8, 3.1 δ (1H, 1H, 1H -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub> de isopropilo), 3.5, 3.8 δ (2H, 2H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-), 4.5 δ (1H, =CH-CH<sub>3</sub> de etilideno), 4.4 (2H, -O-CH<sub>2</sub>-C(O)-), 4.7 δ (2H, -CH<sub>2</sub>-Br), 6.8-7.5 δ (9H, anillos de fenilo). Espectrometría de masas:  $m/z = 514$ , 516 (M+H), 530, 532 (M+H<sub>2</sub>O).

G6PDH-producto del conjugado de la Etapa 14

- 30 Se disolvió 3K G6PDH (920 mg) (preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en la Patente de Estados Unidos No. 6,033,890) en regulador de fosfato 50 mM (que contenía EDTA 1 mM y DTT 0.025 mM) pH 7.2 (3 mL). A este, se añadió DTT 0.5 M (0.15 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 4°C durante 16 horas. El G6PDH 3K activado se concentró utilizando tubos de filtro centrífugos AMICON® con un corte de peso molecular de 30 kDa (Millipore Corporation, Billerica MA). El producto anterior se disolvió de nuevo en regulador fosfato 50 mM (que contenía EDTA 1 mM y DTT 0.025 mM) pH 7.2 (4 mL). A esta mezcla de reacción se añadió el producto de la Etapa 14 (9 mg, se disolvió en 0.2 mL de DMF) y la mezcla de reacción se agitó a 4°C durante 16 horas. El producto 3K G6PDH del conjugado de la Etapa 14 se purificó por diafiltración dos veces como se describió anteriormente. Rendimiento después de la purificación final: 9.6 mg. Espectrometría MALDITOF: G6PDH  $m/z = 54,415$ . G6PDH-Etapa 14  $m/z = 54,793$  (etiqueta 1EDDP por monómero enzimático)

G6PDH-producto de la Etapa 14-SH-Etapa 14

- 40 Se disolvieron 2.4 mg de producto de G6PDH del conjugado de la Etapa 14 en 1 mL de regulador fosfato 50 mM que contenía EDTA 1 mM, pH 7.2. A este, se agregaron 0.4 mL de solución de iminotiolano recién preparada (3 mg/mL). La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 30 minutos con agitación suave. La enzima tiolada (G6PDH-Etapa14-SH) se concentró utilizando tubos de filtro centrífugo micron AMICON® de 30 kDa de peso molecular cortado. La enzima tiolada se disolvió nuevamente en regulador fosfato 50 mM (que contenía EDTA 1 mM y DTT 0.025 mM) pH 7.2 (4 mL). A esta solución se añadió el producto de la Etapa 14 (9 mg, se disolvió en 0.2 mL de DMF) y la mezcla de reacción se agitó a 4°C durante 16 horas. El producto G6PDH del conjugado de la Etapa 14-SH-Etapa14 se purificó por diafiltración dos veces como se describe. Espectrometría MALDITOF: G6PDH-Etapa14  $m/z = 54,793$ , G6PDH-Etapa14-SH-Step 14  $m/z = 57,130$  (4.4 etiquetas EDDP por monómero de enzima).

Ensayo para el Analito de EDDP

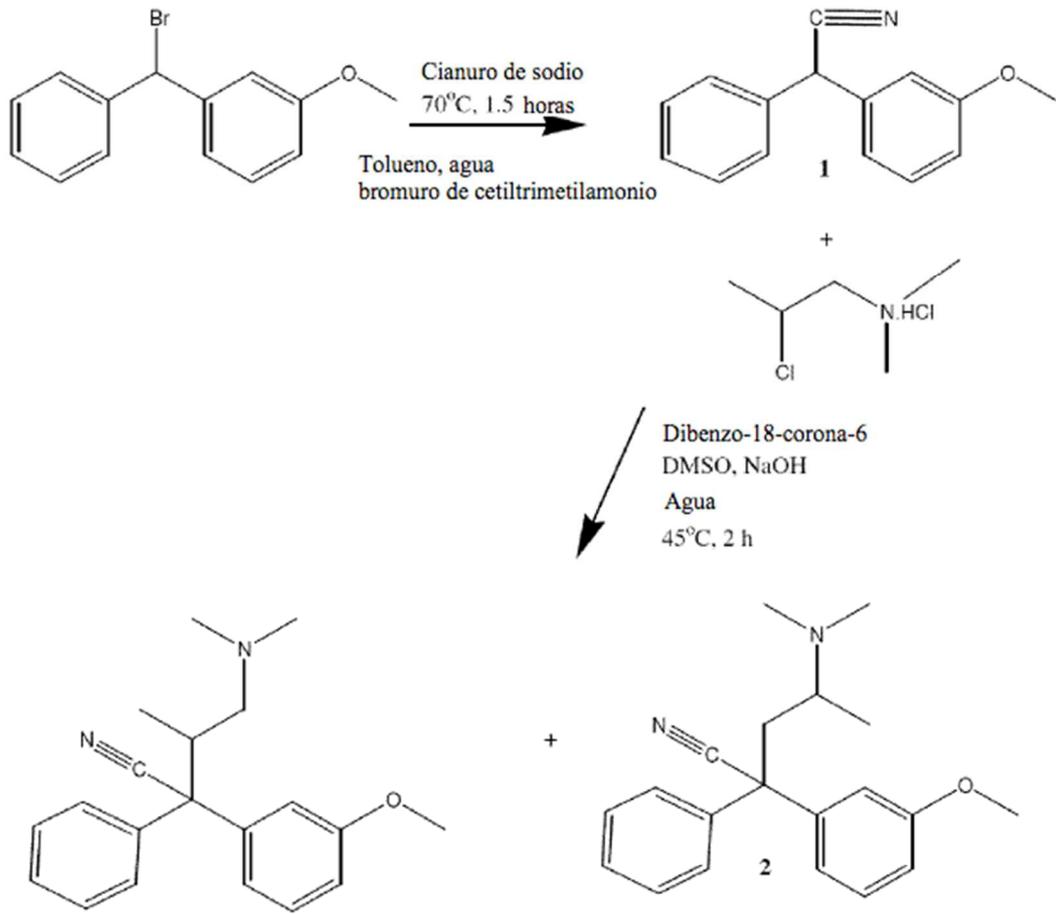
- 50 Los experimentos se realizaron en un espectrofotómetro AGILENT® 8453 UV (Agilent Technologies, Santa Clara CA). Por lo general, 2.5 mL de regulador Tris (50 mM, que contiene 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.8), 0.2 mL de anticuerpo anti-EDDP (1 mg/mL, disponible comercialmente de Lin Zhi International Inc. Sunnyvale CA), 0.1 ml de glucosa-6-fosfato (0.1 M), 0.1 mL de NADP (0.006M) fueron tomados en una cubeta de cuarzo. A esto, se añadieron 0-4029 ng/mL de EDDP en 10 µL de metanol y se mezclaron bien. Luego, se agregaron 10 µL de producto G6PDH de Etapa 14-SH-Etapa 14 (1 mg/mL) y se mezclaron bien. El aumento de la absorbancia a 340 nm se controló a 1 minuto después de la adición de la enzima. Los resultados se resumen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

EDDP (ng/mL)	mAu 340 nm
0	432
370	456
1221	497
4029	561

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende una unidad estructural, seleccionada del grupo que consiste en unidades estructurales de etiqueta de poli(aminoácido), unidades estructurales de etiqueta de no-poli(aminoácido), portadores inmunogénicos de poli(aminoácido) y portadores inmunogénicos de no-poli(aminoácido) unido a 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina en la posición 3 de uno de los anillos de fenilo.
- 5
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la unidad estructural es
- a) un vehículo inmunogénico no-poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas o un vehículo inmunógeno poli(aminoácido) seleccionado del grupo que consiste en albúminas y globulinas
- 10 o
- b) una unidad estructural marcadora poli(aminoácido) que es una enzima o una unidad estructural de etiqueta no-poli(aminoácido) seleccionada del grupo que consiste en polinucleótidos que codifican un catalizador, promotores, colorantes, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, coenzimas, sustratos enzimáticos, grupos radiactivos, moléculas orgánicas pequeñas, secuencias polinucleotídicas amplificables, y partículas.
- 15
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la unidad estructural está unida directamente por un enlace o indirectamente a través de un grupo de enlace.
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la unidad estructural es un marcador de poli(aminoácido) que es una enzima o una unidad estructural de marcación de no-poli(aminoácido) seleccionada del grupo que consiste en polinucleótidos que codifican un catalizador, promotores, colorantes, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, coenzimas, sustratos de enzimas, grupos radiactivos, moléculas orgánicas pequeñas, secuencias de polinucleótidos amplificables y partículas.
- 20
5. Un anticuerpo generado contra un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la unidad estructural es un vehículo inmunogénico de poli(aminoácido) o un vehículo inmunógeno no-poli(aminoácido).
6. Un método para determinar 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina en una muestra sospechosa de contener 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina, comprendiendo el método:
- 25
- (a) proporcionar en combinación en un medio:
- (i) la muestra,
- (ii) un anticuerpo producido contra un compuesto según la reivindicación 1, en donde la unidad estructural es un vehículo inmunogénico de poli(aminoácido) o un vehículo inmunógeno no-poli(de aminoácido), y
- 30 (iii) un conjugado marcado de 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina, y
- (b) examinar el medio para determinar la presencia y/o cantidad de un complejo que comprende 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina y el anticuerpo, la presencia y/o la cantidad del mismo que indica la presencia de 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina en la muestra.
7. Un kit que comprende un anticuerpo para 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina y el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la unidad estructural es una etiqueta de poli(aminoácido) o una etiqueta de no-poli(aminoácido).
- 35



**FIG. 1**

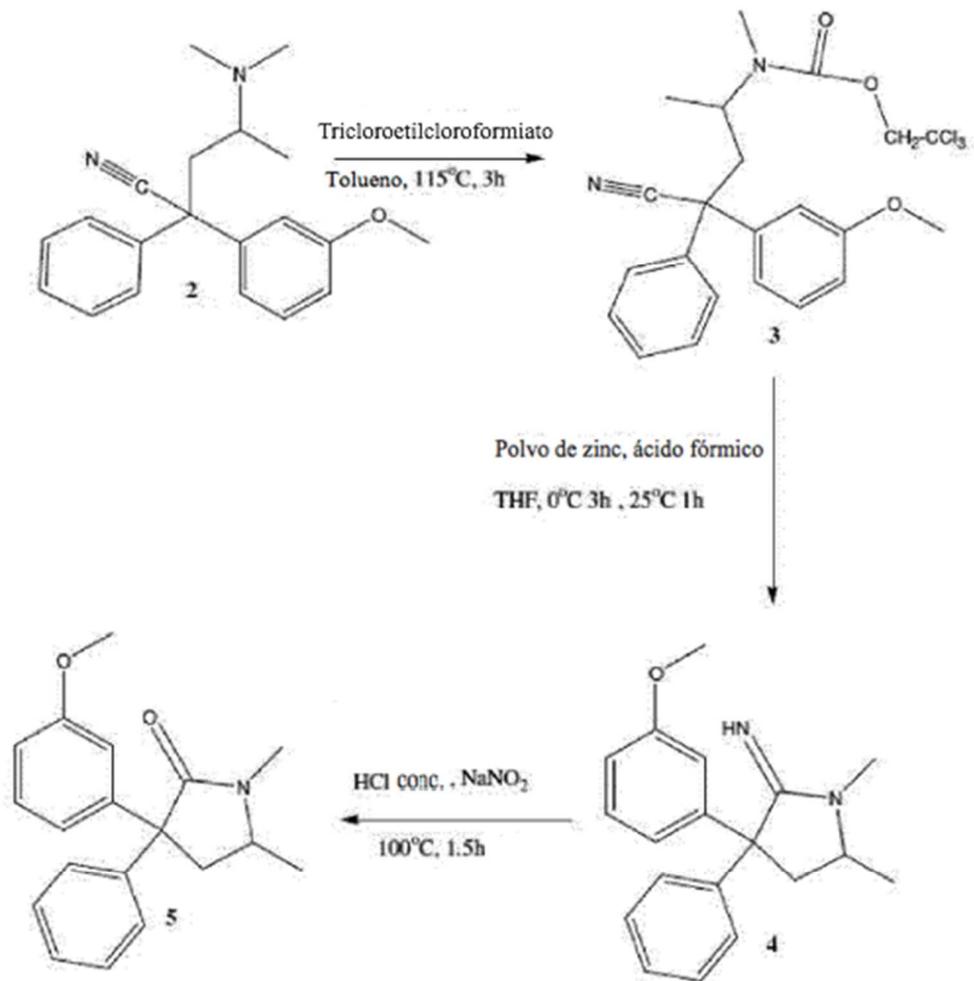


FIG. 2

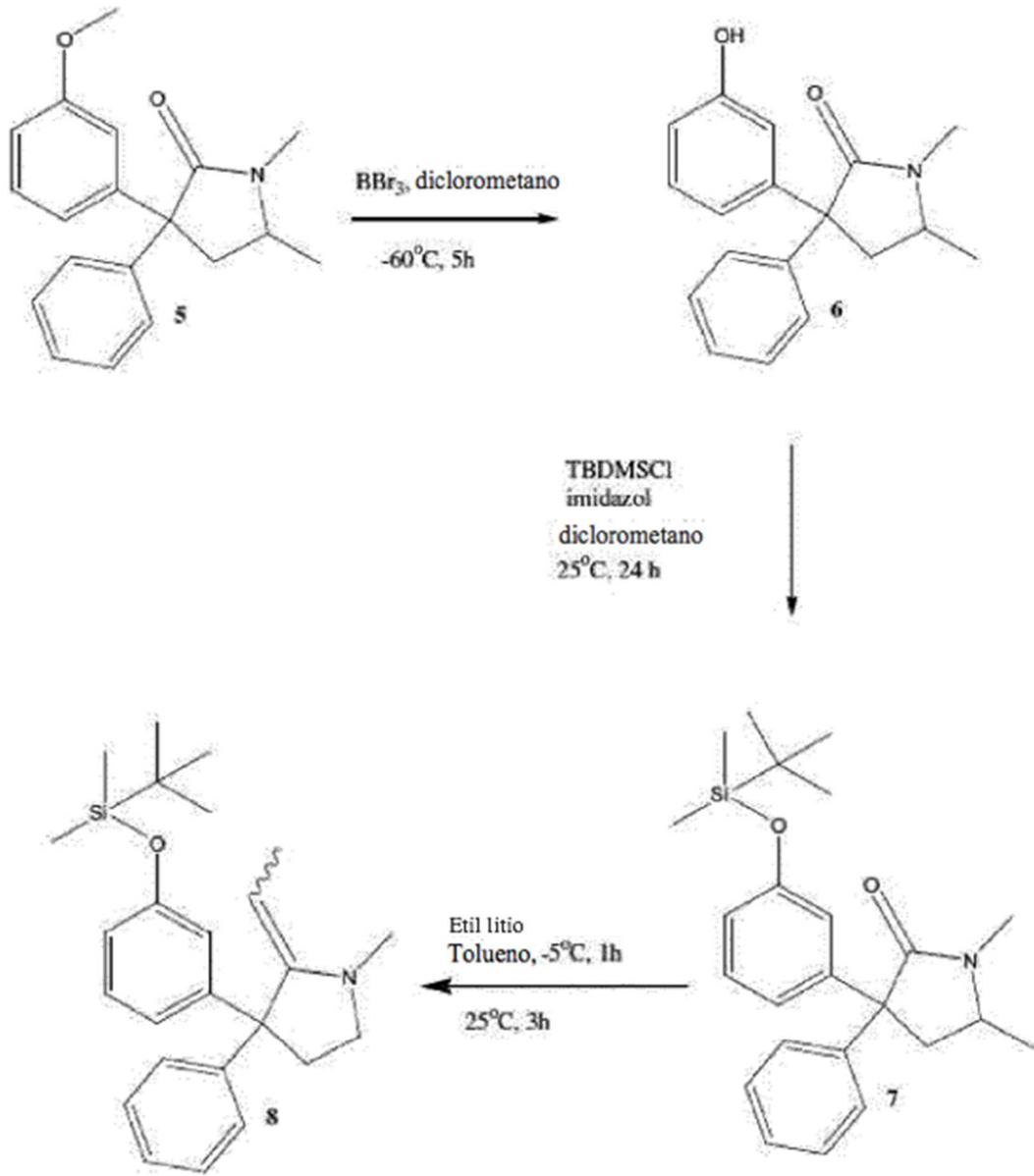


FIG. 3

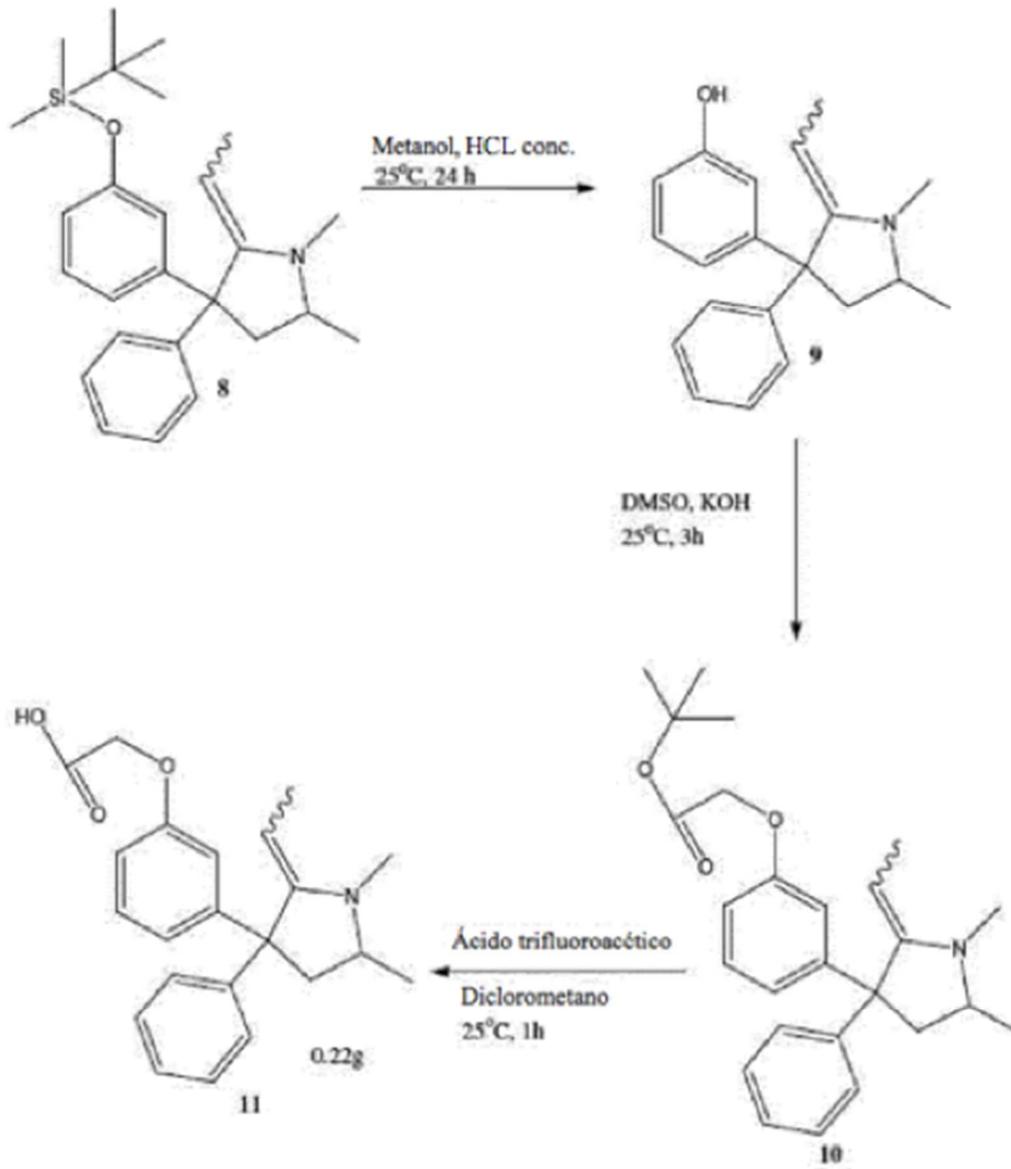


FIG. 4

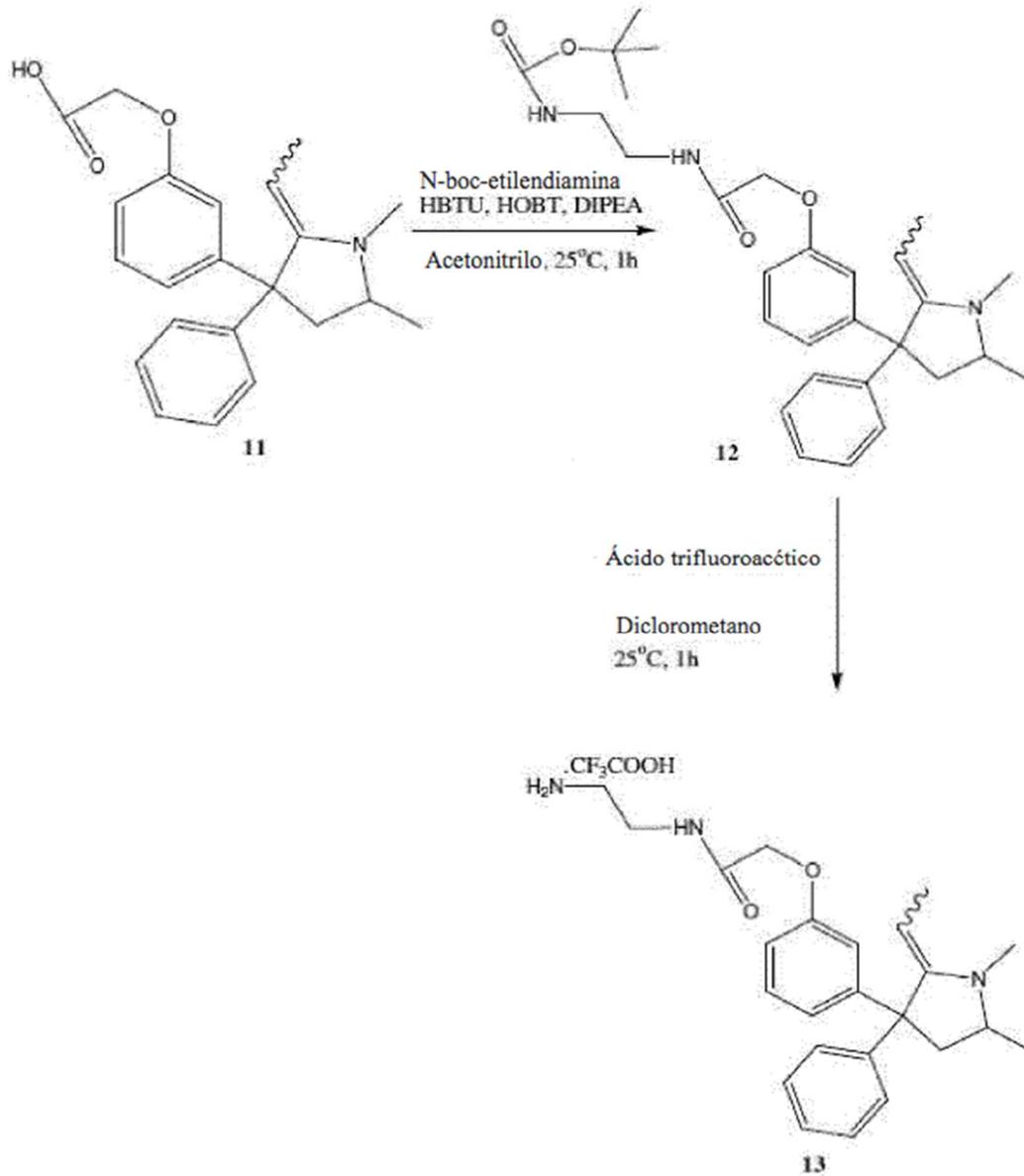
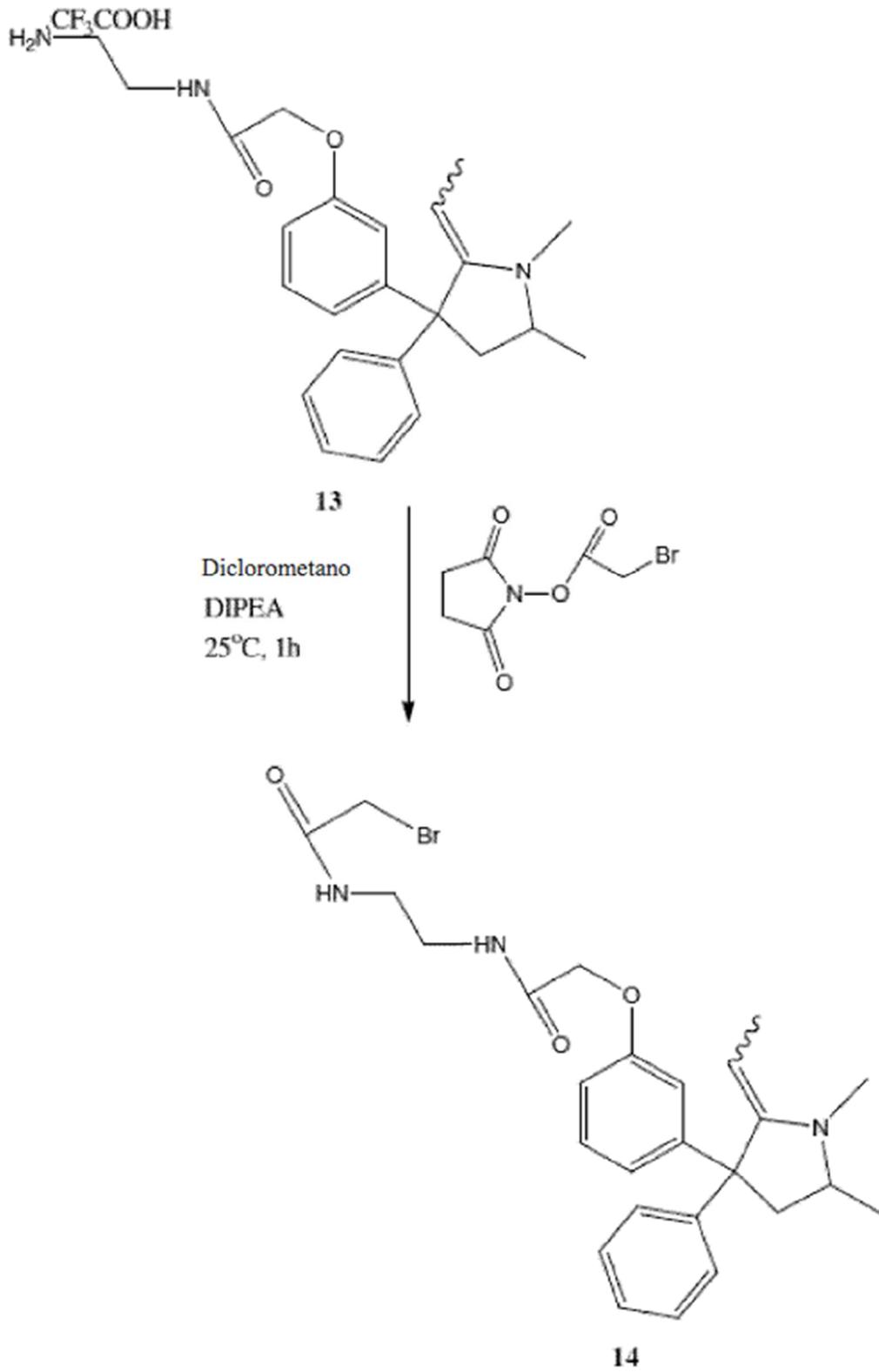


FIG. 5



**FIG. 6**

