

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 963**

51 Int. Cl.:

A61K 38/02 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013 PCT/US2013/055817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031656**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 13830479 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2887952**

54 Título: **Anticuerpos contra haptenos de olanzapina y uso de los mismos**

30 Prioridad:

21.08.2012 US 201261691572 P

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

03.12.2019

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)

Turnhoutseweg 30

2340 Beerse, BE

72 Inventor/es:

HRYHORENKO, ERIC;

SANKARAN, BANUMATHI;

DECORY, THOMAS, R.;

TUBBS, THERESA;

COLT, LINDA;

REMMERIE, BART, M.;

SALTER, RHYS;

DONAHUE, MATTHEW, GARRETT y

GONG, YONG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 733 963 T3

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

DESCRIPCION

Anticuerpos contra haptenos de olanzapina y uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los inmunoensayos, y en particular a los anticuerpos que se unen a la olanzapina, que pueden usarse en inmunoensayos para la detección de la olanzapina.

10 **Antecedentes**

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico crónico y debilitante que afecta aproximadamente al 0,45-1% de la población mundial (van Os, J.; Kapur, S. "Schizophrenia" Lancet 2009, 374, 635-645). Los principales objetivos del tratamiento son lograr una remisión sostenida de los síntomas psicóticos, reducir el riesgo y las consecuencias de la recaída, y mejorar el funcionamiento del paciente y la calidad de vida en general. Aunque muchos pacientes con esquizofrenia son capaces de lograr la estabilidad de los síntomas con los medicamentos antipsicóticos disponibles, la falta de cumplimiento con la medicación es una razón común de recaída con los medicamentos orales administrados diariamente. Varios estudios (Abdel-Baki, A.; Ouellet-Plamondon, C.; Malla, A. "Pharmacotherapy Challenges in Patients with First-Episode Psychosis" Journal of Affective Disorders 2012, 138, S3-S14) que investigan los resultados del incumplimiento han demostrado que los pacientes con esquizofrenia que no toman sus medicamentos según lo prescrito tienen tasas más altas de recaída, ingreso hospitalario y suicidio, así como una mortalidad aumentada. Se estima que el 40 al 75% de los pacientes con esquizofrenia tienen dificultades para seguir un régimen de tratamiento oral diario ((Lieberman, J. A.; Stroup, T. S.; McEvoy, J. P.; Swartz, M. S.; Rosenheck, R. A.; Perkins, D. O.; Keefe, R. S. E.; Davis, S. M.; Davis, C. E.; Lebowitz, B. D.; Severe, J.; Hsiao, J. K. "Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia" New England Journal of Medicine 2005, 353(12), 1209-1223).

La monitorización de fármacos terapéutica (TDM) es la cuantificación de las concentraciones en suero o plasma de fármacos, incluyendo los fármacos antipsicóticos, para la monitorización y la optimización del tratamiento. Dicha monitorización permite, por ejemplo, la identificación de pacientes que no están cumpliendo con su régimen de medicación, que no están alcanzando dosis terapéuticas, que no responden a dosis terapéuticas, que tienen una tolerancia subóptima, que tienen interacciones farmacocinéticas fármaco-fármaco, o que tienen un metabolismo anormal que da como resultado concentraciones en plasmas inapropiadas. Existe una considerable variabilidad individual en la capacidad del paciente para absorber, distribuir, metabolizar y excretar fármacos antipsicóticos. Tales diferencias pueden estar provocadas por enfermedades concurrentes, edad, medicamentos concomitantes o peculiaridades genéticas. Diferentes formulaciones de fármacos también pueden influir en el metabolismo de los fármacos antipsicóticos. La TDM permite la optimización de la dosis para pacientes individuales, mejorando los resultados terapéuticos y funcionales. La TDM también permite que un practicante clínico que prescribe se asegure del cumplimiento con las dosificaciones prescritas y el logro de concentraciones en suero eficaces.

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

El IDELISA™ (hoja de datos IDEL-F083) es un kit ELISA de Olanzapina forense, también capaz de detectar la Clozapina.

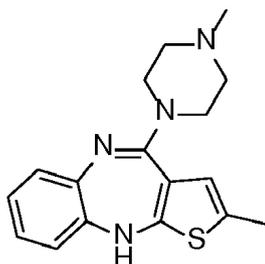
La US5616505 describe intermedios de hapteno atados y conjugados relacionados basados en ácido 3-fenil-1-adamantanoacético.

Bergemann et al. Farmacopsiquiatría. 2004; 37:63-68 describen la concentración en plasma de Olanzapina después de la dosificación de pacientes esquizofrénicos.

La WO 96/30375 describe un polimorfo estable de la Olanzapina ("Forma II").

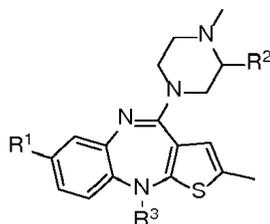
Hay una necesidad de otros métodos para determinar los niveles de fármacos antipsicóticos, particularmente métodos que puedan realizarse en el consultorio del practicante clínico que prescribe (donde el tratamiento para un paciente individual puede ajustarse de una manera mucho más oportuna) y en otros entornos médicos que carecen de equipos de LC o GC/MS o que requieren resultados de las pruebas rápidos.

La olanzapina es:



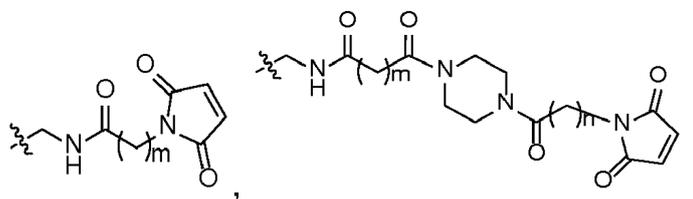
Sumario de la invención

La invención proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a la olanzapina, el método comprendiendo: (i) seleccionar un huésped para la producción de anticuerpos; y (ii) inoculando al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico, en donde el huésped produce un anticuerpo que se une a la olanzapina; en donde Fórmula (I) es:

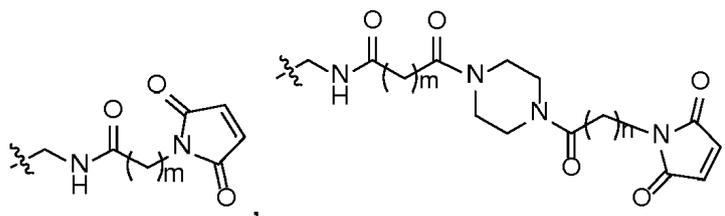


en la que:

R¹ es H,



CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
R² es H,



CH_2NH_2 , o $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$;

R^3 es H; con la condición de que o R^1 o R^2 deben ser H, y con la condición de que tanto R^1 como R^2 pueden no ser H simultáneamente;

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

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

5

La presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico.

10

Las realizaciones actualmente preferidas del anticuerpo son los anticuerpos designados 35 y 61 generados contra el compuesto que tiene la Fórmula II y los anticuerpos designados 3F11 y 4G9-1 generados contra el compuesto que tiene la Fórmula III. Otro inmunógeno adecuado es el compuesto que tiene Fórmula IV.

15

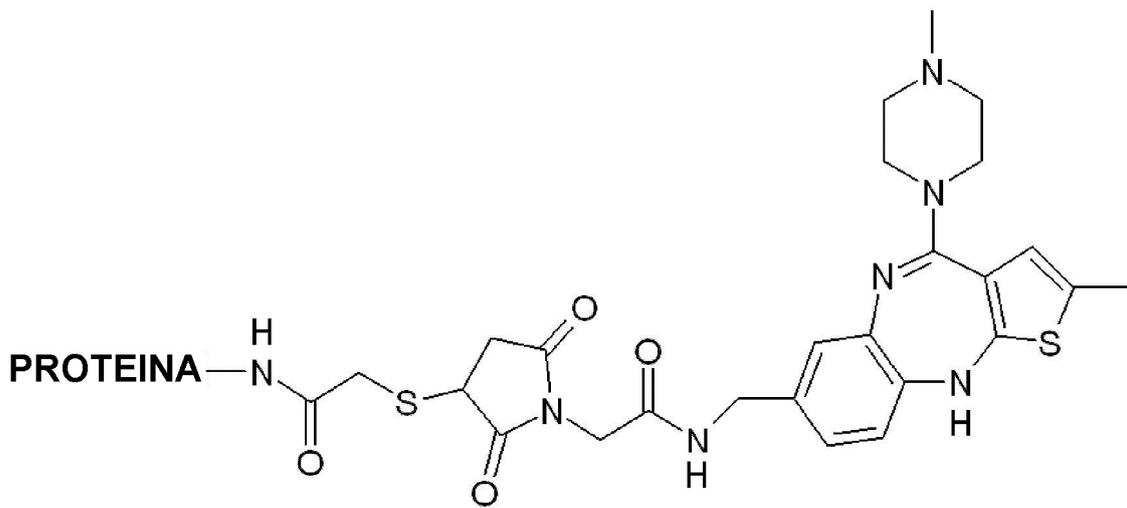
Fórmula II (Compuesto 11):

20

25

30

35



Fórmula III (Compuesto 15):

40

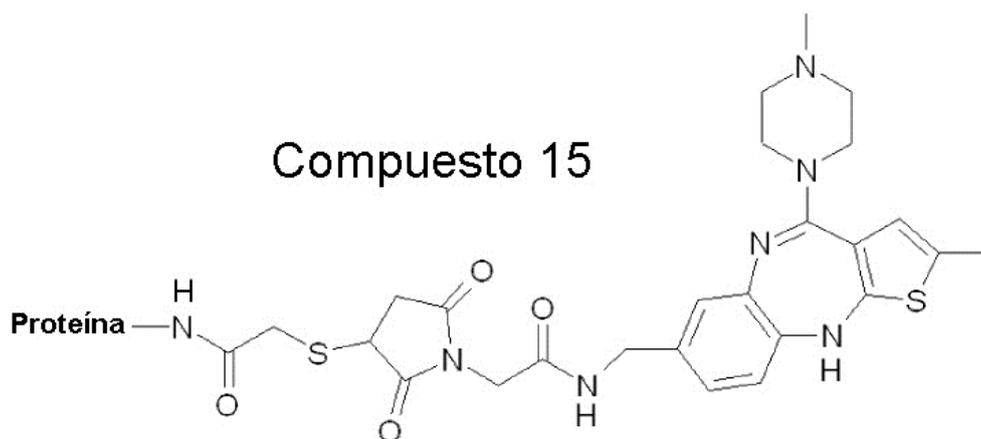
45

50

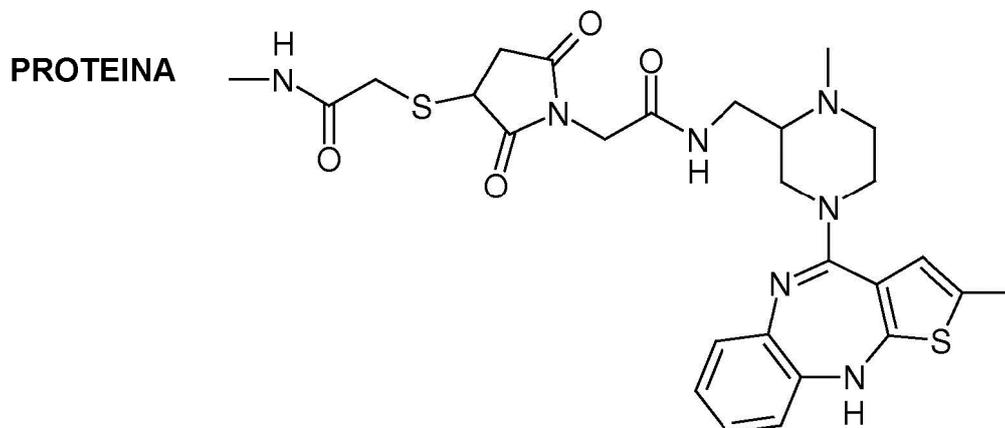
55

60

65



Fórmula IV (Compuesto 10):



Los anticuerpos pueden proporcionarse en kits de ensayo y dispositivos de ensayo, con un dispositivo actualmente preferido siendo un dispositivo de ensayo de flujo lateral que proporciona un análisis del punto de atención.

Además, se proporciona un método para producir una línea celular de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal que se une a la olanzapina. El método comprende: (i) seleccionar un huésped para la producción de anticuerpos; (ii) inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I, como se define anteriormente, y un portador inmunogénico; (iii) fusionar una línea celular del huésped inoculado con una célula que se divide continuamente para crear una célula fusionada capaz de producir un anticuerpo monoclonal que se une a la olanzapina; y (iv) clonar la célula fusionada para obtener una línea celular de hibridoma.

Los anticuerpos pueden usarse en un método para detectar olanzapina en una muestra. El método comprende: (i) poner en contacto una muestra con el anticuerpo que está marcado con un marcador detectable, en donde el anticuerpo marcado y la olanzapina presentes en la muestra forman un complejo marcado; y (ii) detectar el complejo marcado para detectar olanzapina en la muestra.

Los anticuerpos pueden usarse en un método de inmunoensayo competitivo para detectar olanzapina en una muestra. El método comprende: (i) poner en contacto una muestra con el anticuerpo y con olanzapina o un compañero de unión competitivo de la olanzapina, en donde uno del anticuerpo y de la olanzapina o compañero de unión competitivo de la misma está marcado con un marcador detectable, y en donde la olanzapina de la muestra compite con la olanzapina o compañero de unión competitivo de la misma para unirse al anticuerpo; y (ii) detectar el marcador para detectar una muestra de olanzapina.

Objetos, características y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una consideración detallada de las realizaciones preferidas que siguen.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1-3 muestran los resultados de ELISA competitivos generados con tres hibridomas 11.1 de fusión de ratón diferentes;

La Fig. 4 muestra el formato de inmunoensayo competitivo usado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral;

La Fig. 5 muestra una curva de respuesta a la dosis típica generada con el clon 35 del anticuerpo olanzapina;

La Fig. 6 muestra una curva de respuesta a la dosis típica generada con el clon 61 del anticuerpo olanzapina;

La Fig. 7 muestra una curva de respuesta a la dosis típica generada con el anticuerpo 3F11 de olanzapina;

La Fig. 8 muestra el diseño de chip de un dispositivo de ensayo de flujo lateral;

La Fig. 9 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para un control positivo de aripiprazol generado con el anticuerpo 5C7 y un compañero de unión competitivo a aripiprazol marcado;

La Fig. 10 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para un control positivo de olanzapina generado con el anticuerpo 4G9-1 y un compañero de unión competitivo a la olanzapina marcada;

La Fig. 11 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para un control positivo de quetiapina generado con el anticuerpo 11 y un compañero de unión competitivo a la quetiapina marcada;

La Fig. 12 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para un control positivo de risperidona generado con el anticuerpo 5-9 y un compañero de unión competitivo a la risperidona marcada;

La Fig. 13 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para una muestra que contiene aripiprazol generado con el anticuerpo 5C7 de aripiprazol en presencia del compañero de unión competitivo de aripiprazol marcado, sin curva de respuesta de dosis para olanzapina, quetiapina o risperidona en presencia

de un compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 14 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para una muestra que contiene olanzapina generada con el anticuerpo 4G9-1 de olanzapina en presencia de un compañero de unión competitivo de la olanzapina marcada, sin curva de respuesta a la dosis para aripiprazol, quetiapina o risperidona en presencia

5 de un compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 15 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para una muestra que contiene quetiapina generada con el anticuerpo 11 de quetiapina en presencia de un compañero de unión competitivo de quetiapina marcado, sin curva de respuesta a la dosis para aripiprazol, olanzapina o risperidona en presencia

10 de un compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 16 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para una muestra que contiene risperidona generada con el anticuerpo 5-9 de risperidona en presencia de un compañero de unión competitivo de risperidona marcado, sin curva de respuesta a la dosis para aripiprazol, olanzapina o quetiapina en presencia

15 de un compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 17 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para una muestra que contiene aripiprazol generado con el anticuerpo 5C7 de aripiprazol en presencia de un compañero de unión competitivo de aripiprazol marcado, sin una curva de respuesta a la dosis para olanzapina, quetiapina o risperidona en presencia del anticuerpo y compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

20 de un compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 18 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para una muestra que contiene olanzapina generada con el anticuerpo 4G9-1 de olanzapina en presencia de un compañero de unión competitivo de olanzapina marcado, sin curva de respuesta a la dosis para aripiprazol, quetiapina o risperidona en presencia del anticuerpo y compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

25 de un compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 19 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para una muestra que contiene quetiapina generada con el anticuerpo 11 de quetiapina en presencia de un compañero de unión competitivo de quetiapina marcado, sin curva de respuesta a la dosis para aripiprazol, olanzapina o risperidona en presencia del anticuerpo y compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

30 de un compañero de unión competitivo marcado para cada uno;

La Fig. 20 muestra una curva de respuesta a la dosis típica para una muestra que contiene risperidona generada con el anticuerpo 5-9 de risperidona en presencia de un compañero de unión competitivo de risperidona marcado, sin curva de respuesta a la dosis para aripiprazol, olanzapina o quetiapina en presencia de anticuerpo y compañero de unión competitiva marcado para cada uno;

35 de un compañero de unión competitiva marcado para cada uno;

La Fig. 21 muestra una comparación de la curva de respuesta a la dosis de aripiprazol generada como control positivo con la curva de respuesta a la dosis de aripiprazol generada en el formato múltiplex;

La Fig. 22 muestra una comparación de la curva de respuesta a la dosis de olanzapina generada como control positivo con la curva de respuesta a la dosis de olanzapina generada en el formato múltiplex;

40 de un compañero de unión competitiva marcado para cada uno;

La Fig. 23 muestra una comparación de la curva de respuesta a la dosis de quetiapina generada como control positivo con la curva de respuesta a la dosis de quetiapina generada en el formato múltiplex; y

45 de un compañero de unión competitiva marcado para cada uno;

La Fig. 24 muestra una comparación de la curva de respuesta a la dosis de risperidona generada como control positivo con la curva de respuesta a la dosis de risperidona generada en el formato múltiplex.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

40

La invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado que se une a la olanzapina. El anticuerpo puede usarse en un kit de ensayo y un dispositivo de ensayo que comprende el anticuerpo. También se proporcionan métodos para producir el anticuerpo y para producir una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo. El anticuerpo puede usarse en un método para detectar olanzapina en una muestra, incluyendo un método de inmunoensayo competitivo.

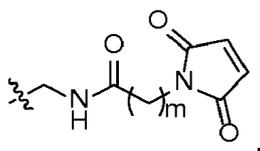
45

En una realización, la presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I como se ha definido anteriormente, y un portador inmunogénico.

50

En una realización adicional, la presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico; donde:

55 R^1 es H,

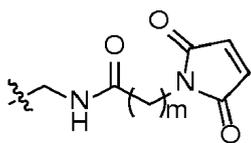


60

CH_2NH_2 , o $CH_2NHC(O)(CH_2)_mCO_2H$;

R^2 es H,

65



5

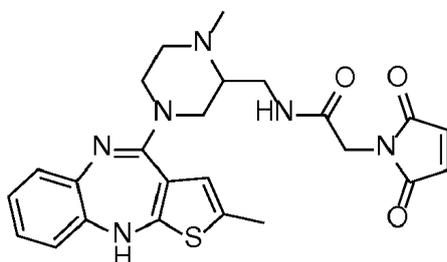
CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H; con la condición de que o R¹ o R² deben ser H, y además con la condición de que R¹ y R² pueden no ser H simultáneamente; R³ es H; m es 1, 2, 3, 4 o 5; n es 1, 2, 3, 4 o 5.

10

En una realización preferida, la presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula V y un portador inmunogénico.

15

Formula V



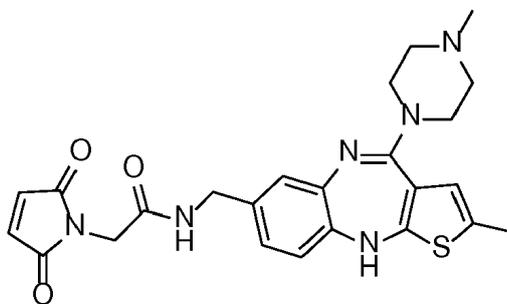
20

25

En una realización preferida, la presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula VI y un portador inmunogénico.

30

Formula VI



35

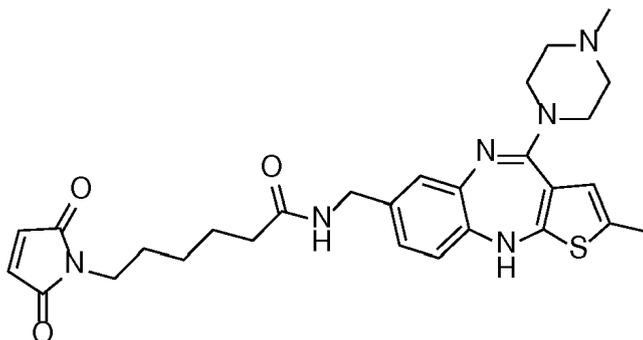
40

45

En una realización preferida, la presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula VII y un portador inmunogénico.

50

Formula VII



55

60

65

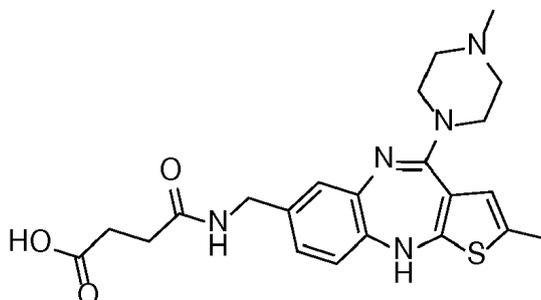
En una realización preferida, la presente invención puede usarse para producir un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula VIII y un portador inmunogénico.

5

Formula VIII

10

15



20

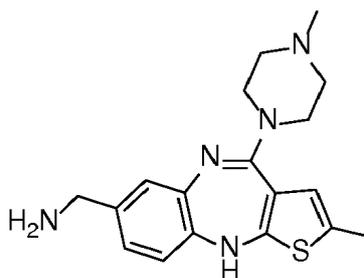
En una realización preferida, la presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula IX y un portador inmunogénico.

25

Formula IX

30

35



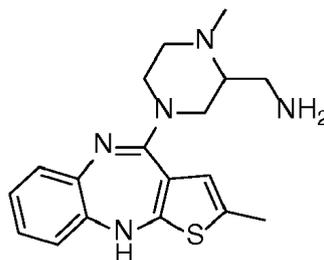
40

En una realización preferida, la presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a la olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula X y un portador inmunogénico.

45

Formula X

50



55

Preferiblemente, el anticuerpo se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto seleccionado de los compuestos de: Fórmula I, Fórmula V, Fórmula VI, Fórmula VII, Fórmula VIII, Fórmula IX y Fórmula X; y un portador inmunogénico.

60

Detalles adicionales de los compuestos descritos por las fórmulas anteriores y los conjugados formados por los compuestos y un portador inmunogénico se proporcionan en la sección siguiente titulada "Compuestos, Conjugados e Inmunógenos".

65

Detalles adicionales de los anticuerpos de la presente invención se proporcionan en la sección siguiente titulada "Anticuerpos".

El anticuerpo puede usarse en un kit de ensayo que comprende el anticuerpo, así como un dispositivo de ensayo que comprende el anticuerpo. Preferiblemente, el dispositivo de ensayo es un dispositivo de ensayo de flujo

lateral. Los detalles adicionales de los kits de ensayo y los dispositivos de ensayo se proporcionan a continuación en la sección titulada "Kits y Dispositivos de Ensayo".

La invención proporciona además un método para producir un anticuerpo que se une a la olanzapina, el método comprendiendo: (i) seleccionar un huésped para la producción de anticuerpos; y (ii) inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I, como se ha definido anteriormente, y un portador inmunogénico, en donde el huésped produce un anticuerpo que se une a la olanzapina. En realizaciones adicionales, el conjugado usado en el método puede ser un conjugado de un compuesto seleccionado de los compuestos de: Fórmula V, Fórmula VI, Fórmula VII, Fórmula VIII, Fórmula IX y Fórmula X; y un portador inmunogénico. Detalles adicionales sobre la producción de los anticuerpos se proporcionan en la sección siguiente titulada "Anticuerpos".

Se proporciona además un método para producir una línea celular de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal que se une a la olanzapina. El método comprende: (i) seleccionar un huésped para la producción de anticuerpos; (ii) inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I, como se ha definido anteriormente, y un portador inmunogénico; (iii) fusionar una línea celular del huésped inoculado con una célula que se divide continuamente para crear una célula fusionada capaz de producir un anticuerpo monoclonal que se une a la olanzapina; y (iv) clonar la célula fusionada para obtener una línea celular de hibridoma. En realizaciones adicionales, el conjugado usado en el método puede ser un conjugado de un compuesto seleccionado de los compuestos de: Fórmula V, Fórmula VI, Fórmula VII, Fórmula VIII, Fórmula IX y Fórmula X; y un portador inmunogénico.

El anticuerpo puede usarse en un método para detectar olanzapina en una muestra. El método comprende: (i) poner en contacto una muestra con el anticuerpo que está marcado con un marcador detectable, en donde el anticuerpo marcado y la olanzapina presentes en la muestra forman un complejo marcado; y (ii) detectar el complejo marcado para detectar la olanzapina en la muestra. Detalles adicionales sobre el método de detección de olanzapina se proporcionan en la sección siguiente titulada "Inmunoensayos".

El anticuerpo puede usarse en un método de inmunoensayo competitivo para detectar olanzapina en una muestra. El método comprende: (i) poner en contacto una muestra con el anticuerpo, y con olanzapina o un compañero de unión competitivo de la olanzapina, en donde uno del anticuerpo y la olanzapina o compañero de unión competitivo de la misma está marcado con un marcador detectable, y en donde la olanzapina de la muestra compete con la olanzapina o compañero de unión competitivo de la misma para unirse al anticuerpo; y (ii) detectar el marcador para detectar una muestra de olanzapina. Detalles adicionales sobre el método competitivo de inmunoensayo para detectar olanzapina se proporcionan la sección siguiente titulada "Inmunoensayos".

La detección de olanzapina se acompaña preferiblemente por la detección de uno o más analitos además de la olanzapina. Preferiblemente, el uno o más analitos son fármacos antipsicóticos distintos de la olanzapina, y más preferiblemente los fármacos antipsicóticos distintos de la olanzapina se seleccionan del grupo que consiste de: aripiprazol, risperidona, paliperidona, quetiapina y metabolitos de los mismos.

Como se ha tratado anteriormente, los anticuerpos pueden usarse en ensayos para detectar la presencia y/o la cantidad del fármaco antipsicótico en muestras de pacientes. Tal detección permite la monitorización terapéutica del fármaco permitiendo todos los beneficios del mismo. La detección de niveles de fármacos antipsicóticos puede ser útil para muchos propósitos, incluyendo: la determinación de la adherencia o cumplimiento del paciente con la terapia prescrita; uso como herramienta de decisión para determinar si un paciente debe convertirse de un régimen antipsicótico oral a un régimen antipsicótico inyectable de acción prolongada; uso como una herramienta de decisión para determinar si el nivel de dosis o el intervalo de dosificación de los antipsicóticos orales o inyectables deberían aumentarse o disminuirse para garantizar el logro o el mantenimiento de niveles de fármacos eficaces o seguros; uso como ayuda en el inicio de la terapia con fármacos antipsicóticos proporcionando evidencia del logro de niveles mínimos de pK; uso para determinar la bioequivalencia del fármaco antipsicótico en formulaciones múltiples o de múltiples fuentes; uso para evaluar el impacto de la polifarmacia y las potenciales interacciones fármaco-fármaco; y uso como una indicación de que un paciente debe ser excluido o incluido en un ensayo clínico y como una ayuda en la monitorización posterior del cumplimiento con los requisitos de medicamentos del ensayo clínico.

COMPUESTOS, CONJUGADOS E INMUNOGENOS

En relación con los compuestos y conjugados e inmunógenos, se usan las siguientes abreviaturas: AMAS es éster de N-(α -maleimidoacetoxi)succinimida; BTG es tiroglobulina bovina; Bu₃N es tributilamina; DCC es dicitclohexilcarbodiimida; DCM es diclorometano; DIEA es diisopropiltilamina; DMF es N,N-dimetilformamida; DMSO es dimetilsulfóxido; EDTA es ácido etilendiaminotetracético; KLH es hemocianina de lapa californiana; SATA es S-acetiltioacetato de N-succinimidilo; TEA es trietilamina; THF es tetrahidrofurano; TFA es ácido trifluoroacético; r.t. es temperatura ambiente; DIC es diisopropilcarbodiimida; DMAP es N,N-dimetil-4-aminopiridina; EDC es clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; NHS es N-hidroxisuccinimida; TFP es tetrafluorofenilo; PNP es p-nitrofenilo; TBTU es tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio; HOBT es N-

hidroxibenzotriazol; DEPBT es 3-(dietoxi-fosforilo)-1,2,3-benzotrazin-4(3H)-ona; BOP-Cl es cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico; y DTT es ditioeritritol.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65

5 Como se usa en la presente, un "espaciador" se refiere a una porción de una estructura química que conecta dos o más subestructuras como haptenos, portadores, inmunógenos, marcadores o compañeros de unión a través de un grupo de enlace funcional. Estos grupos espaciadores están compuestos por los átomos que típicamente presentes y ensamblados de las maneras típicamente encontradas en los compuestos orgánicos y, por tanto, pueden ser referidos como "grupos espaciadores orgánicos". Los bloques de construcción químicos usados para ensamblar los espaciadores se describirán a continuación en esta solicitud. Entre los espaciadores preferidos están las cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas. Estas cadenas de carbono también pueden incluir uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos que reemplazan uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o en los extremos terminales de las cadenas. Por 10 "heteroátomos" se entiende átomos distintos al carbono que se eligen del grupo que consiste de oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, en donde los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación y pueden tener carbono u otros heteroátomos unidos a ellos. El espaciador también puede incluir grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como una sustitución en uno de los átomos en la cadena.

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

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

25 Los grupos espaciadores pueden usarse para enlazar el hapteno con el portador. Los espaciadores de diferentes longitudes permiten unir el hapteno con distancias diferentes del portador para la presentación al sistema inmunológico del animal o ser humano inmunizado para la optimización del proceso de formación de anticuerpos. La unión a diferentes posiciones en la molécula de hapteno brinda la oportunidad de presentar sitios específicos en el hapteno al sistema inmune para influir en el reconocimiento de anticuerpos. El espaciador puede contener grupos de solubilización hidrófilos para hacer que el derivado de hapteno sea más soluble en medios acuosos. Los ejemplos de grupos de solubilización hidrófilos incluyen, pero no están limitados a, grupos polioxilalquilo, por ejemplo, cadenas de polietilenglicol; grupos hidroxilo, carboxilato y sulfonato.

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

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

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

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

55 El término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo que incluye uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos que reemplazan uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o en los extremos terminales de las cadenas.

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

65 El término "alcoxi" se refiere a radicales de cadena lineal o ramificada de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique lo contrario, unidos a un átomo de oxígeno. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi y butoxi.

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

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

10 El término "grupo carboxilato" incluye ácidos carboxílicos y ésteres de carboxilato de alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo.

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

15 El término "heteroarilo" se refiere a radicales de anillos aromáticos de 5 a 7 miembros mono- u 8 a 10 miembros bicíclicos, cualquiera de los cuales puede consistir de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O o S donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación permitido. Los ejemplos incluyen benzimidazolilo, benzotiazolilo, benzotienilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, pirazinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolinilo, tiazolilo y tienilo.

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

25 El término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo C₁₋₆ que contiene un sustituyente arilo. Los ejemplos incluyen bencilo, feniletilo o 2-naftilmetilo.

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

30 El término "sulfonilo" se refiere al grupo -S(O)₂R_b, donde R_b es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, haloalquilo, arilo, aralquilo y heteroarilo. Un "agente de sulfonilación", añade el grupo -(S)O₂R_a a una molécula.

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

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

tetrafluorofenilos (TFP) pueden prepararse mediante la reacción de ácidos carboxílicos con 2,3,5,6-tetrafluorofeniltrifluoroacetato en presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiletilamina en un disolvente aprótico bajo condiciones anhidras como informa Wilbur, et al., Bioconjugate Chem., 2004, 15(1):203. Un experto en la técnica reconocerá que los espaciadores mostrados en la Tabla 1, entre otros, pueden obtenerse usando métodos conocidos y unirse a haptenos que llevan amino utilizando optimización rutinaria de las condiciones de reacción. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un portador.

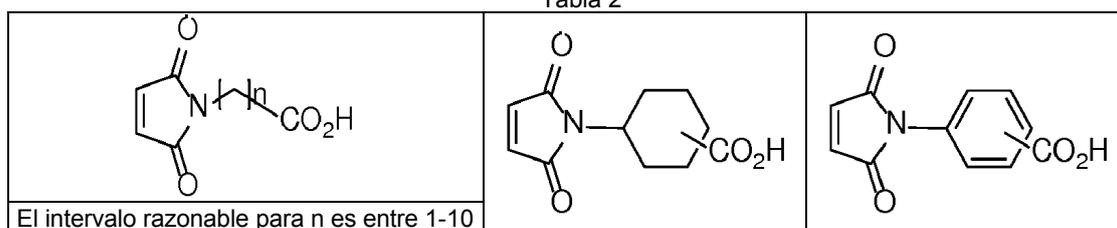
Tabla 1

10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		Los valores razonables para m y n están entre 1 y 10

El acoplamiento directo de la amina en el hapteno y una funcionalidad de ácido carboxílico en el bloque de construcción espaciador en presencia de un agente de acoplamiento también puede usarse como un modo de unión. Los reactivos preferidos son aquellos que se usan típicamente en la síntesis de péptidos. Los reactivos de acoplamiento de péptidos incluyen, pero no están limitados a, tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU, CAS N° 125700-67-6), ver: Pruhs, S., Org. Process. Res. Dev. 2006, 10:441; N-hidroxibenzotriazol (HOBT, CAS N° 2592-95-2) con un agente deshidratante de carbodiimida, por ejemplo N-N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC) clorhidrato de 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)carbodiimida, ver: König W., Geiger, R. Chem. Ber., 1970, 103(3):788; 3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotrazin-4(3H)-ona (DEPBT, CAS N°165534-43-0), ver: Liu, H. et.al., Chinese Chemical Letters, 2002, 13(7):601; cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico; (BOP-Cl, CAS N° 68641-49-6), ver: Diago-Meseguer, J et.al. Synthesis, 1980, 7:547-51 y otros descritos en detalle por Benoiton en Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005, Capítulo 2, y el boletín técnico proporcionado por Advanced Automated Peptide Protein Technologies (aapptec), 6309 Shepardsville Rd., Louisville KY 40228, ph 888 692 9111; www.aapptec.com, y referencias en los mismos. Estos métodos crean un enlace de amida estable que une el hapteno con el espaciador. Ejemplos de espaciadores que pueden obtenerse usando métodos conocidos y unirse a haptenos que llevan amino utilizando optimización rutinaria de las condiciones de reacción que emplean los métodos descritos y citados anteriormente, se muestran, pero no están limitados a, en la Tabla 2. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un portador.

Tabla 2



Los espaciadores también pueden construirse por pasos mediante la unión secuencial de los grupos químicos apropiados al hapteno, incluyendo el paso de formar el grupo de enlace funcional que es capaz de unirse al portador. Ver ejemplos ilustrativos en los Esquemas de reacción generales.

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

Para haptenos que llevan un grupo de ácido carboxílico, los modos de unión de una porción espaciadora al hapteno incluyen activación del grupo de ácido carboxílico como un haluro de acilo o éster activo, ejemplos de los cuales se muestran en la Tabla 3, la preparación de los cuales se ha descrito anteriormente, seguida de por reacción con un amino (-NH₂-), hidrazino (-NH-NH₂-), hidrazido (-C(O)-NH-NH₂-) o grupo hidroxilo (-OH) en la porción espaciadora para formar un enlace amida, hidrazida, diacilhidracina o éster, o acoplamiento directo del grupo de ácido carboxílico con un grupo amino en la porción espaciadora o directamente en el portador con un reactivo de acoplamiento de péptidos y/o reactivo de deshidratación de carbodiimida, descritos anteriormente, cuyos ejemplos se muestran en las Tablas 4 y 5. Los procedimientos encontrados en las referencias citadas anteriormente para la formación de ésteres activados y el uso de agentes de acoplamiento de péptidos pueden emplearse para la unión de haptenos que llevan ácido carboxílico con bloques de construcción de espaciadores y portadores de proteínas con grupos amino disponibles que utilizan optimización rutinaria de las condiciones de reacción.

Tabla 3

5					
10	Sulfo NHS y NHS		TFP	X=Cl, B Cloruro de acilo	PNP

Tabla 4

15				
20	HOBT	DEPTO	BOP-Cl	TBTU

Tabla 5

30			
35	diisopropilcarbodiimida (DIC)	Diciclohexilcarbodiimida (DCC)	1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.HCl (EDC)

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



o grupo de fósforo electrófilo, por ejemplo:



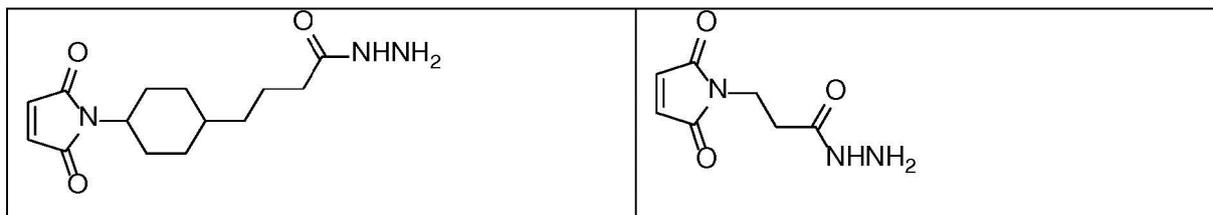
50 Ver: Malachowski, William P., Coward, James K., Journal of Organic Chemistry, 1994, 59 (25):7616 o:



60 R_c es alquilo, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo.
Ver: Aliouane, L., et.al, Tetrahedron Letters, 2011, 52(28):8681.

65 Los haptenos que llevan grupos aldehído o cetona pueden unirse a espaciadores usando métodos que incluyen, pero no están limitados a, reacción con un grupo de hidrazida H₂N-NH-C(O)- en el espaciador para formar una acilhidrazona, ver: Chamow, S.M., Kogan, T.P., Peers, D.H., Hastings, R.C., Byrn, R.A. y Askenasz, A., J. Biol. Chem., 1992, 267(22): 15916. En la Tabla 6 se muestran ejemplos de grupos espaciadores de hidracida bifuncionales que permiten la unión a un grupo tiol en el portador.

Tabla 6

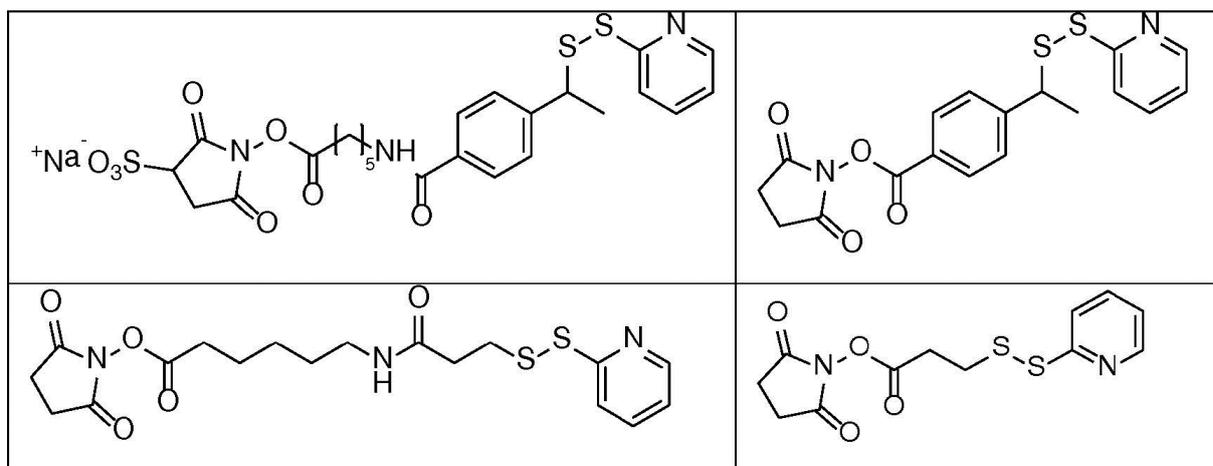


Los haptenos también pueden contener grupos tiol que pueden reaccionar con el portador siempre que el portador se haya modificado para proporcionar un grupo que pueda reaccionar con el tiol. Los grupos portadores pueden modificarse mediante métodos que incluyen, pero no están limitados a, la unión de un grupo que contiene un grupo funcional maleimida mediante reacción de un grupo amino en el portador con maleimidoacetato de N-succinimidilo, (AMAS, CAS N° 55750-61-3), yodoacetato de succinimidilo (CAS N° 151199-81-4), o cualquiera de los grupos espaciadores bifuncionales mostrados en la Tabla 1 para introducir un grupo que puede someterse a una reacción que provoque la unión del hapteno al portador.

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

Se pueden usar grupos disulfuro particulares, por ejemplo, piridildisulfuros, como el grupo de enlace funcional en el espaciador que puede someterse a intercambio con un grupo tiol en el portador para formar un enlace de disulfuro mixto, ver: Ghetie, V., et al., *Bioconjugate Chem.*, 1990, 1:24-31. Estos espaciadores pueden unirse mediante reacción del hapteno que contiene amina con un éster activo que está unido a un espaciador que lleva el grupo piridildisulfuro, ejemplos del cual incluyen pero no están limitados a los que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7



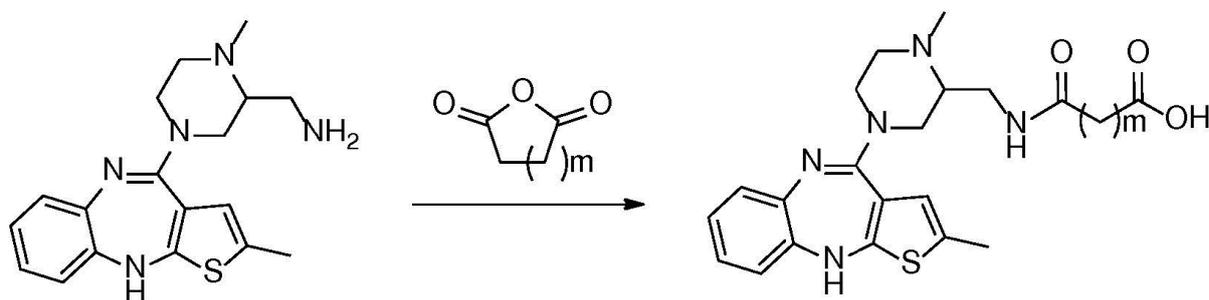
Muy a menudo, el portador es una proteína y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina pueden usarse para la unión, ya sea directamente por reacción con un grupo de enlace funcional reactivo de amina o después de la derivación con un grupo que contiene tiol, incluyendo el N-succinimidil S -Acetiltoacetato, (SATA, CAS 76931-93-6), o un análogo de los mismos, seguido de la escisión del grupo acetato con hidroxilamina para exponer el grupo tiol

para reacción con el grupo de enlace funcional en el hapteno. Los grupos tiol también pueden introducirse en el portador mediante reducción de enlaces disulfuro dentro de portadores de proteínas con reactivos reductores suaves que incluyen, pero no están limitados a, 2-mercaptoetilamina, ver: Bilal, M., et al., Bioelectrochemistry, 2010, 80(1):49, reactivos de fosfina, ver: Kirley, T.L., Analytical Biochemistry, 1989, 180(2):231 o ditioeritrol (DTT, CAS 3483-12-3) Cleland, W., Biochemistry, 1964, 3:480-482.

ESQUEMAS GENERALES DE REACCIÓN

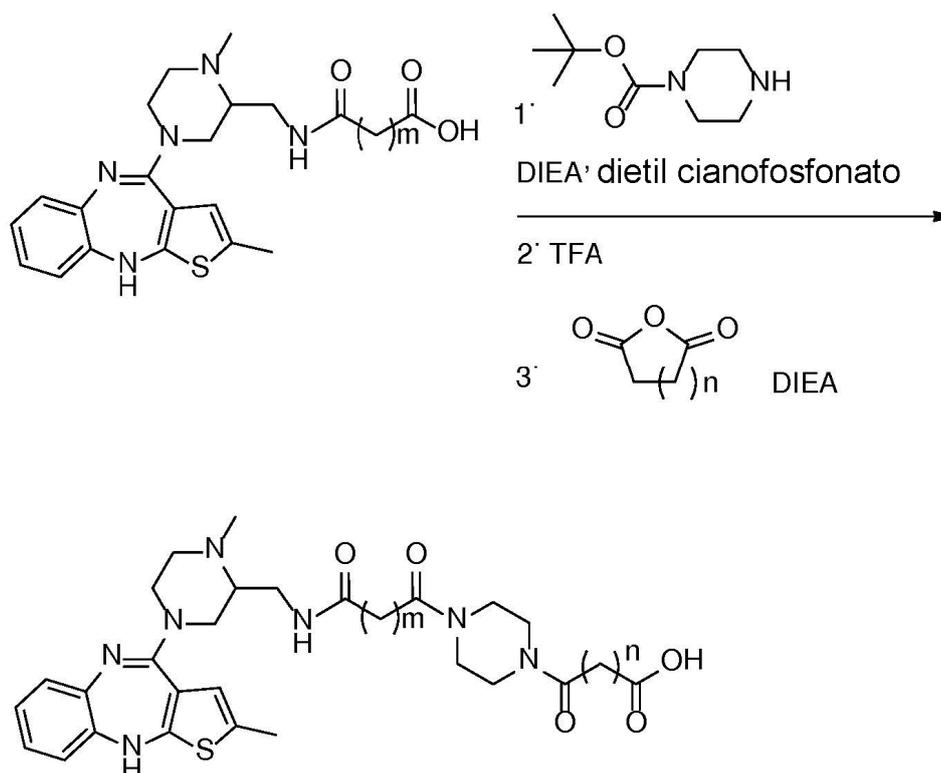
Los compuestos útiles para producir anticuerpos pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos sintéticos generales descritos a continuación. Los compuestos de Fórmula (I) pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los siguientes esquemas de reacción solo pretenden representar ejemplos y no se pretende de ninguna manera que sean un límite de la invención.

Esquema 1

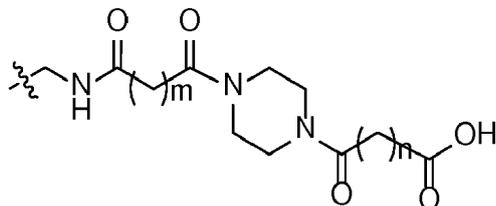


Los compuestos de Fórmula I en los que R^2 es $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ pueden elaborarse de acuerdo con el Esquema 1. La reacción de (1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)metanamina, preparada como se describe en el Ejemplo 1, Paso I, procede con un compuesto de anhídrido cíclico, como anhídrido succínico o anhídrido glutárico, en un solvente como la piridina, a temperaturas que varían de temperatura ambiente a 60 °C, durante aproximadamente 48 horas. Los expertos en la técnica reconocerán que puede usarse la misma química para crear compuestos de Fórmula I en los que R^1 es $\text{CH}_2\text{NHC(O)(CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$.

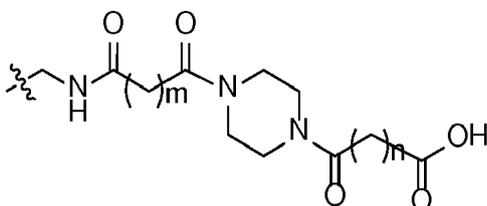
Esquema 2



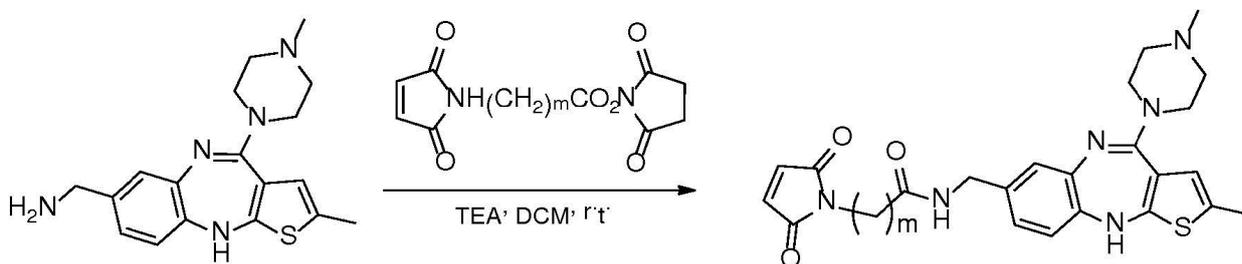
Los compuestos donde R² es



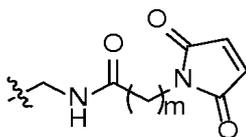
pueden elaborarse de acuerdo con el Esquema 2. Los compuestos de Fórmula I, donde R² es CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H, preparados como se describe en el Esquema 1, se tratan con *N*-*t*-butoxicarbonilpiperazina, cianofosfonato de dietilo, y una base, como diisopropiletilamina. La reacción se lleva a cabo en un solvente, como diclorometano, durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La desprotección del grupo piperazinilo se realiza con anhídrido trifluoroacético como se describe en el Esquema 2, seguido de reacción con un anhídrido apropiado, como anhídrido succínico o anhídrido maleico, en presencia de una base adecuada como diisopropiletilamina. Los expertos en la técnica reconocerán que puede usarse la misma química para crear compuestos donde R¹ es



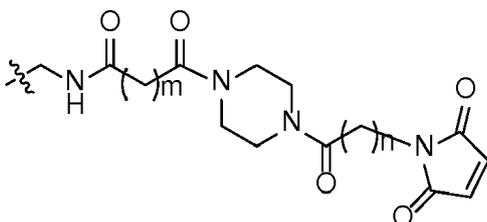
Esquema 3



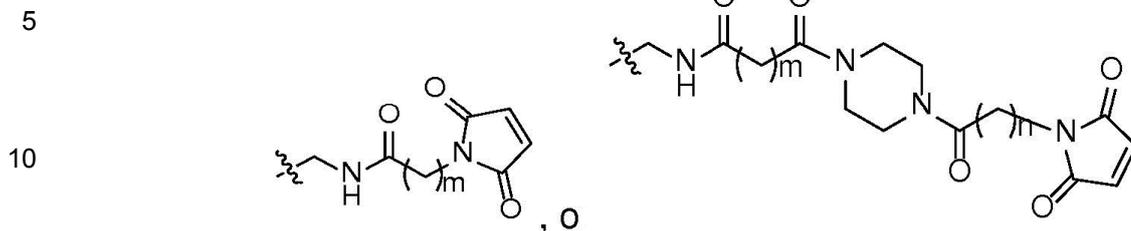
Los compuestos de Fórmula I donde R¹ es



pueden elaborarse de acuerdo con el Esquema 3. La maleimida puede introducirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Los grupos de funcionalización de maleimida, como el 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, donde m es 1, pueden usarse en un solvente como DMF o CH₂Cl₂, y una base, como tributilamina o trietilamina. Alternativamente, el grupo piperazinilo desprotegido descrito en el Esquema 2 puede elaborarse con una funcionalidad maleimida, como se describe en el Esquema 3 para dar compuestos de Fórmula I donde R¹ es

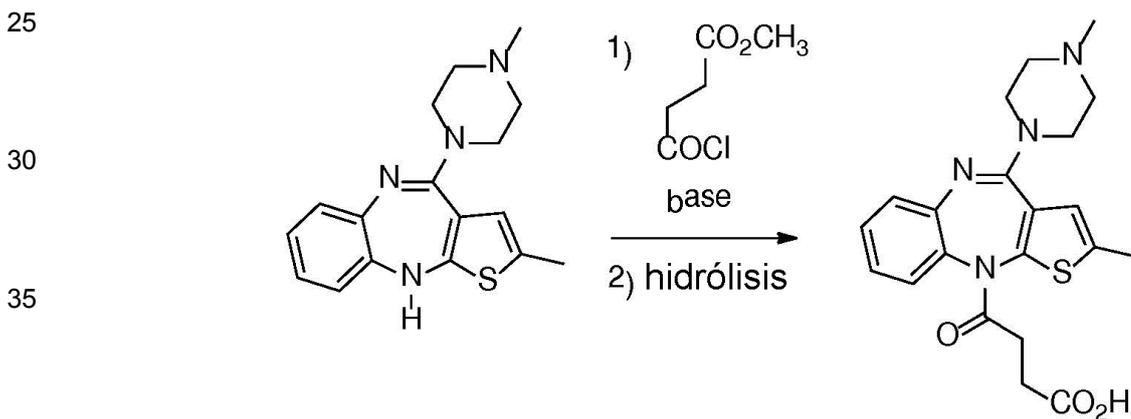


Los expertos en la materia reconocerán que se puede usar la misma química para crear compuestos de Fórmula I donde R² es



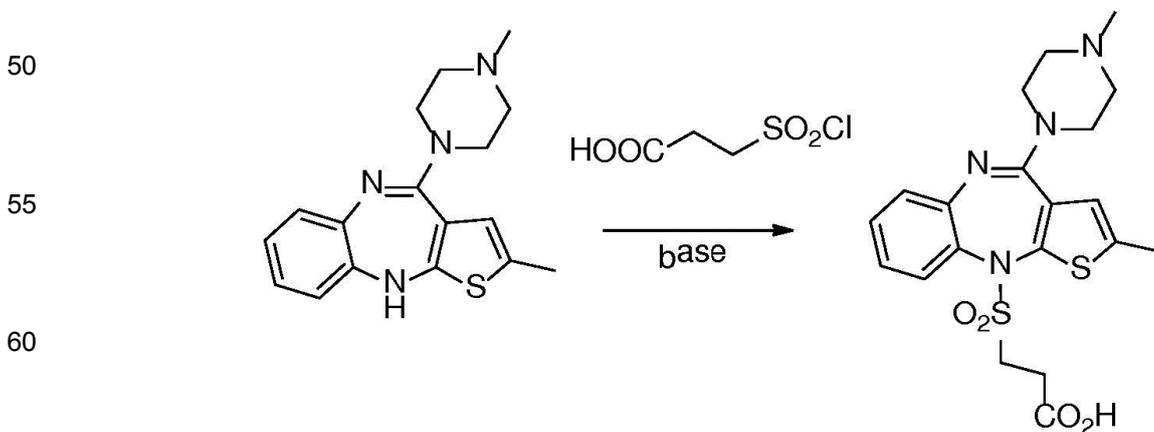
15 Los compuestos en los que el espaciador y el grupo de enlace se unen al nitrógeno secundario no sustituido en el anillo de diazepina de la olanzapina pueden obtenerse mediante las reacciones representadas en los esquemas 4 a 8. La acilación del nitrógeno se describe en Su, J. et al., Bioorganic y med. Chem. Letters, 2006,16:4548. El uso del cloruro de mono ácido de mono éster del ácido succínico en presencia de una base, bajo condiciones anhidras en un solvente aprótico, proporciona un producto intermedio, cuya funcionalidad éster puede hidrolizarse usando condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, base acuosa, para proporcionar un hapteno que puede elaborarse adicionalmente en un inmunógeno mediante métodos descritos previamente en la presente e ilustrados mediante ejemplos de esta divulgación.

Esquema 4



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

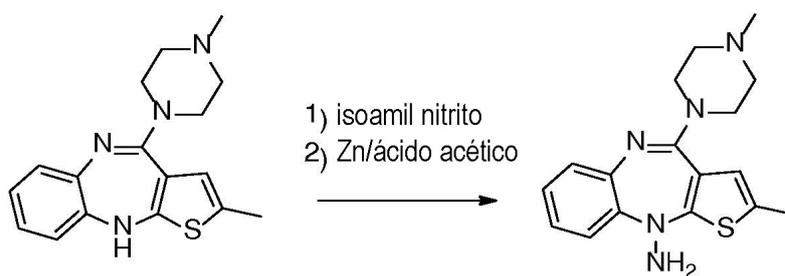
Esquema 5



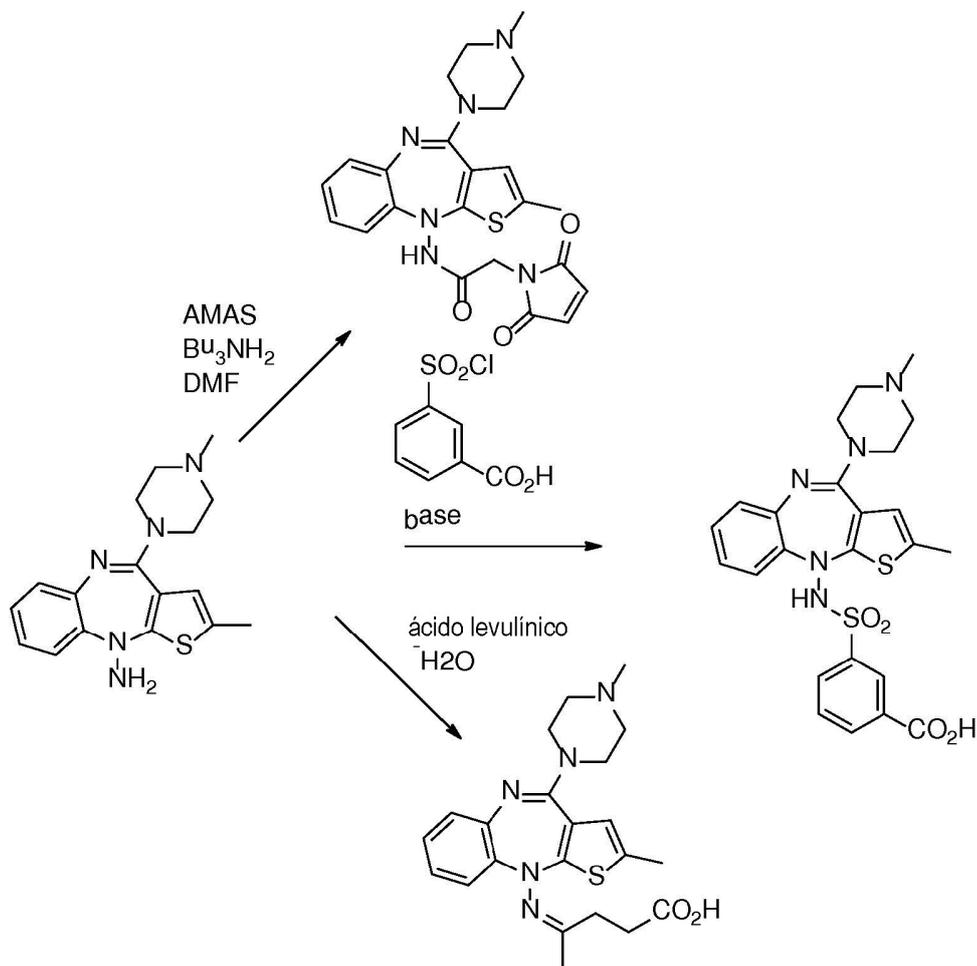
65 Su, et al., anteriormente, también enseñan métodos para la preparación de una hidracina como se muestra

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

Esquema 6

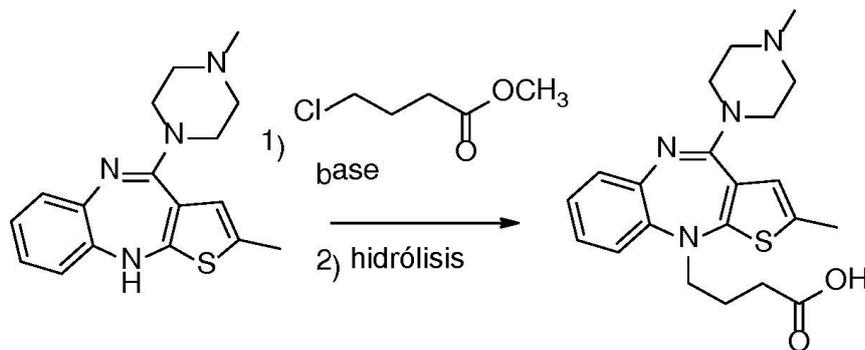


Esquema 7

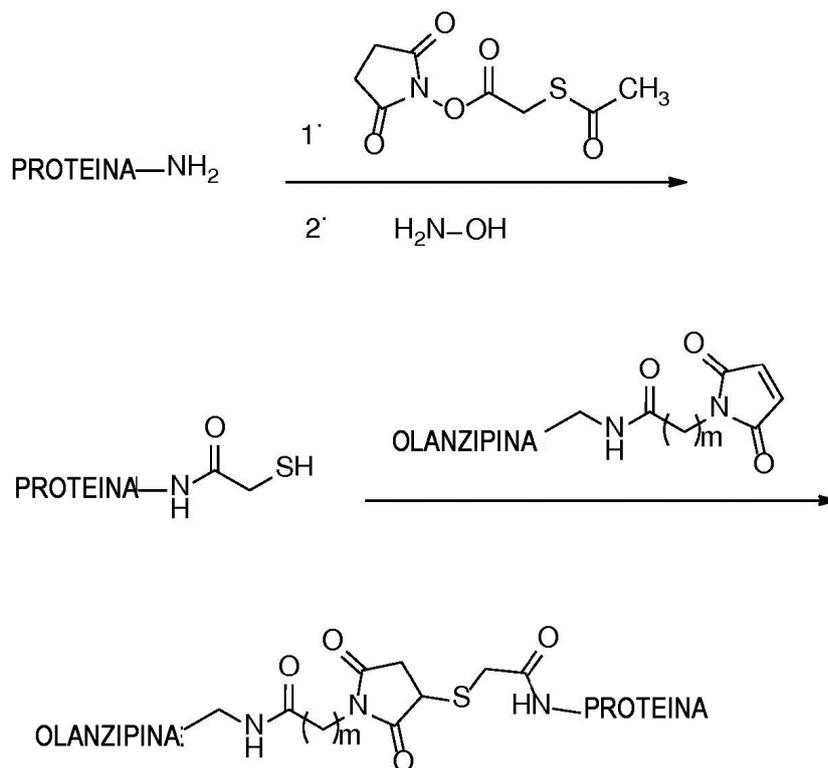


La alquilación directa del nitrógeno del anillo como se muestra en el Esquema 8, también puede lograrse usando el método descrito en la US6034078 para añadir un grupo alquilo directamente a la olanzapina. Aunque el uso de un haluro de alquilo funcionalizado, por ejemplo, 4-clorometilbutirato, se puede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

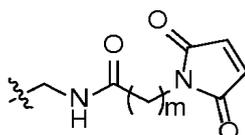
Esquema 8



Esquema 9

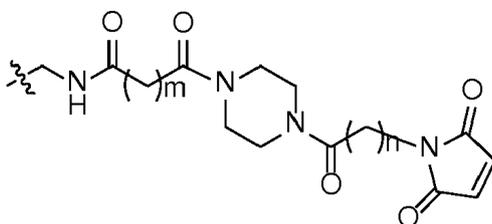


Los haptenos funcionalizados con maleimida en donde R¹ o R² es

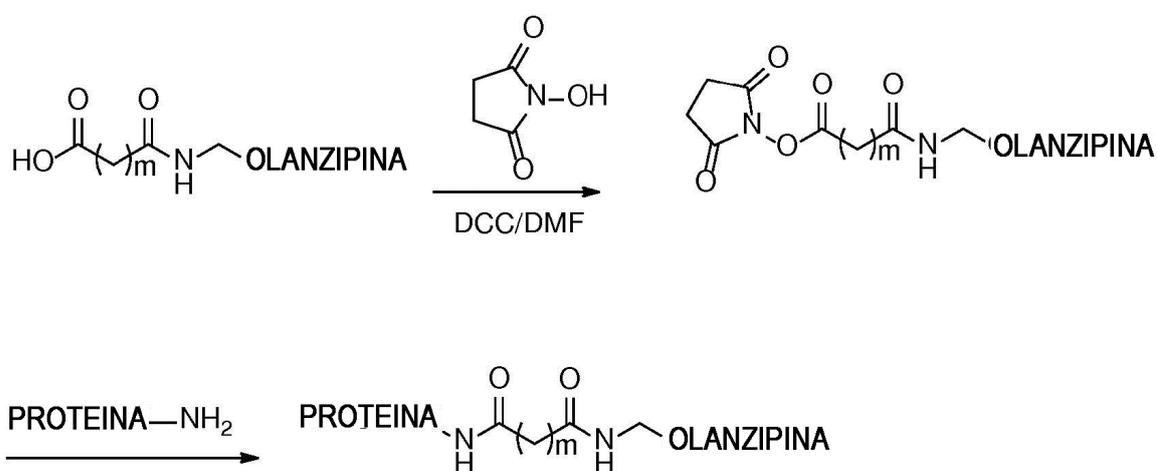


puede conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 9. La activación de residuos de proteína lisina por acilación del épsilon-nitrógeno con S-acetilthioacetato de N-succinimidilo (SATA), seguido de la posterior hidrólisis del grupo S-acetilo con hidroxilamina produce un grupo sulfhidrilo nucleófilo. La conjugación de la

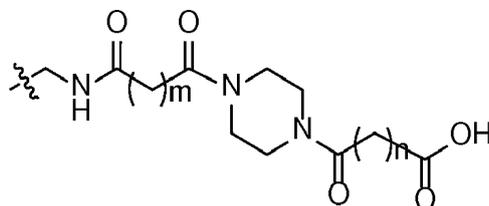
proteína activada con sulfhidrido con el hapteno derivado de maleimida (preparado como se describe en el esquema general 3) se realiza mediante una reacción de adición de Michael. Las proteínas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina. Puede usarse la misma metodología para conjugar proteínas con haptenos funcionalizados con maleimida donde R¹ o R² es



Esquema 10



Los haptenos funcionalizados con ácido carboxílico, en donde R¹ o R² es CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H, pueden conjugarse con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 10. La reacción con N-hidroxisuccinimida y un agente de acoplamiento adecuado, como dicitohexilcarbodiimida, y una base, como tributilamina, en un solvente como DMF, a una temperatura de aproximadamente 20° C, durante aproximadamente 18 horas activa el ácido carboxílico con el grupo saliente de hidroxipirrolidina-2,5-diona. El conector activado y el hapteno pueden luego conjugarse con una proteína en un solvente, como un tampón de fosfato de pH 7,5, a aproximadamente 20° C, durante aproximadamente 2,5 horas. Los expertos en la técnica conocen las proteínas adecuadas e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina. Puede usarse la misma metodología para conjugar proteínas con haptenos funcionalizados con ácido carboxílico donde R¹ o R² es



ANTICUERPOS

La presente invención puede usarse para elaborar un anticuerpo aislado o un fragmento de unión del mismo, que se une a olanzapina y que se genera en respuesta a un conjugado de un compuesto de Fórmula I, como se define anteriormente, y un portador inmunogénico. El término "anticuerpo" se refiere a una proteína específica capaz de unirse a un antígeno o porción del mismo (capaz de unirse a un fármaco antipsicótico o metabolito del mismo). Un anticuerpo se produce en respuesta a un inmunógeno que se puede haber introducido en un huésped, por ejemplo, un animal o un humano, mediante inyección. El término genérico "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de anticuerpos.

"Anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo de unión a antígeno" se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo, que compite con el anticuerpo intacto por la unión. Hablando de manera general, se dice que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es menor o igual a $1 \mu\text{M}$, preferiblemente menor o igual a 100 nM y lo más preferible menor o igual a 10 nM . La unión puede medirse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, un ejemplo siendo el uso de un instrumento BIAcore™.

Los fragmentos de anticuerpo comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los fragmentos de unión incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos.

Como se usa en la presente, "epítopo" incluye cualquier determinante de proteínas capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente de agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que dos anticuerpos "se unen al mismo epítopo" si un anticuerpo demuestra que compite con el segundo anticuerpo en un ensayo de unión competitiva, por cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (como el método BIAcore™ referenciado anteriormente). En referencia a un hapteno (como olanzapina u otro fármaco antipsicótico), se puede generar un anticuerpo contra la molécula de hapteno no antigénica conjugando el hapteno con un portador inmunogénico. Luego se genera un anticuerpo que reconoce un "epítopo" definido por el hapteno.

"Aislado" cuando se usa en el contexto de un anticuerpo significa alterado "por la mano del hombre" de cualquier estado natural; es decir, que, si tiene lugar en la naturaleza, se ha cambiado o eliminado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un anticuerpo de origen natural presente naturalmente en un animal vivo en su estado natural no está "aislado", pero el mismo anticuerpo separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", como se emplea el término en la presente. Los anticuerpos pueden darse en una composición, como un reactivo de inmunoensayo, que no son composiciones de origen natural, y en ella permanecen anticuerpos aislados dentro del significado de ese término como se emplea en la presente.

"Reactividad cruzada" se refiere a la reacción de un anticuerpo con un antígeno que no se usó para inducir ese anticuerpo.

Preferiblemente, el anticuerpo se unirá al fármaco y a cualquier metabolito farmacológicamente activo deseado. Alterando la localización de la unión del portador inmunogénico a los compuestos, en los anticuerpos pueden diseñarse la selectividad y la reactividad cruzada con los metabolitos. Para la olanzapina, puede ser deseable o no la reactividad cruzada con el fármaco relacionado clozapina, y la puede ser deseable o no reactividad cruzada con los metabolitos de la olanzapina como 10-N-glucuronida o 4-N-desmetil olanzapina. Pueden generarse anticuerpos que detectan varios de estos fármacos y/o metabolitos, o pueden generarse anticuerpos que detectan cada uno por separado (definiendo así las propiedades de "unión específica" del anticuerpo). Un anticuerpo se une específicamente a uno o más compuestos cuando su unión del uno o más compuestos es equimolar o sustancialmente equimolar.

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

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

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

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante los métodos de hibridoma bien establecidos de Kohler y Milstein, por ejemplo, Nature 256:495-497 (1975). Los métodos de hibridoma implican típicamente

inmunizar un huésped o linfocitos de un huésped, recolectar linfocitos que secretan o que tienen el potencial de secretar el anticuerpo monoclonal, fusionar los linfocitos con células inmortalizadas y seleccionar células que secretan el anticuerpo monoclonal deseado.

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

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

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

25 Como las células de hibridoma secretan típicamente anticuerpos extracelularmente, pueden ensayarse los medios de cultivo para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para el fármaco antipsicótico. La inmunoprecipitación de los ensayos de unión *in vitro*, por ejemplo, puede usarse radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), para medir la especificidad de
30 unión de los anticuerpos monoclonales.

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

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y/o purificarse a partir de un medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina (Ig) convencionales que incluyen, pero no están limitados a, A-SEPHAROSE de polipéptidos, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis,
40 precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos recombinantes como los que se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 4.166.452. El ADN que codifica anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos
45 que se unen específicamente a los genes de la cadena de anticuerpo pesada y ligera murinos, preferiblemente al ADN de la sonda aislado de líneas de células de hibridoma de anticuerpos monoclonales que secretan anticuerpos específicos para fármacos antipsicóticos.

También se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específicos para el fármaco antipsicótico. Tales fragmentos incluyen, pero no están limitados a, los fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse et al., Science 256:1270-1281 (1989)). Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv
50 pueden expresarse y secretarse todos a partir de *Escherichia coli*, permitiendo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., BioTechnology 10:163-167 (1992)). Los expertos en la técnica conocen otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. También se conciben fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) (ver las Patentes de Estados Unidos Nº 5.761.894 y 5.587.458).
55 Los fragmentos Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, es probable que muestren una unión no específica reducida. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.642.870, por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

65

KITS DE ENSAYO Y DISPOSITIVOS

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

La frase "kit de ensayo" se refiere a un conjunto de materiales y reactivos que se usa para realizar un ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse en combinación empaquetada en el mismo recipiente o en recipientes separados, dependiendo de sus reactividades cruzadas y estabilidades, y en forma líquida o liofilizada. Las cantidades y proporciones de reactivos proporcionados en el kit pueden seleccionarse para proporcionar resultados óptimos para una aplicación particular. Un kit de ensayo que incorpora características de la presente divulgación comprende anticuerpos que se unen con olanzapina. El kit puede comprender además compañeros de unión competitivos de olanzapina y materiales de calibración y control.

La frase "material de control y calibración" se refiere a cualquier estándar o material de referencia que contiene una cantidad conocida de un analito. Una muestra que se sospecha que contiene un analito y el material de calibración correspondiente se analizan bajo condiciones similares. La concentración de analito se calcula comparando los resultados obtenidos para el espécimen desconocido con los resultados obtenidos para el estándar. Esto se hace comúnmente construyendo una curva de calibración.

Los anticuerpos pueden incluirse en un kit, recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para su utilización. Cuando los anticuerpos se suministran en un kit, los diferentes componentes del inmunoensayo pueden envasarse en recipientes separados y mezclarse antes de su uso. Tal envasado de los componentes por separado puede permitir el almacenamiento a largo plazo sin disminuir sustancialmente el funcionamiento de los componentes activos. Además, los reactivos pueden envasarse bajo ambientes inertes, por ejemplo, bajo una presión positiva de gas nitrógeno, gas argón o similares, lo cual es especialmente preferido para los reactivos que son sensibles al aire y/o la humedad.

Los reactivos incluidos en los kits pueden suministrarse en todo tipo de recipientes, de tal manera que se conservan sustancialmente las actividades de los diferentes componentes, mientras que los componentes en sí no se adsorben o alteran sustancialmente por los materiales del recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, pero no están limitados a, ampollas, botellas, tubos de ensayo, viales, matraces, jeringuillas, sobres, por ejemplo, revestidos con papel de aluminio, y similares. Los recipientes pueden estar compuestos de cualquier material adecuado incluyendo, pero no limitados a, vidrio, polímeros orgánicos, por ejemplo, policarbonato, poliestireno, polietileno, etc., cerámica, metal, por ejemplo, aluminio, aleaciones metálicas, por ejemplo, acero, corcho y similares. Además, los recipientes pueden comprender uno o más puertos de acceso estériles, por ejemplo, para el acceso a través de una aguja, como se puede proporcionar con un tabique. Los materiales preferidos para los tabiques incluyen caucho y politetrafluoroetileno del tipo vendido con el nombre comercial TEFLON por DuPont (Wilmington, DE). Además, los recipientes pueden comprender dos o más compartimentos separados por particiones o membranas que pueden retirarse para permitir la mezcla de los componentes.

Los kits de reactivos también pueden suministrarse con materiales de instrucción. Las instrucciones pueden estar impresas, por ejemplo, en papel y/o suministrarse en un medio legible electrónicamente. Alternativamente, las instrucciones pueden proporcionarse dirigiendo a un usuario a una página web Internet, por ejemplo, especificada por el fabricante o distribuidor del kit y/o a través de correo electrónico.

El anticuerpo también puede proporcionarse como parte de un dispositivo de ensayo. Tales dispositivos de ensayo incluyen dispositivos de ensayo de flujo lateral. Un tipo común de dispositivo de ensayo de flujo lateral desechable incluye una zona o área para recibir la muestra líquida, una zona de conjugado y una zona de reacción. Estos dispositivos de ensayo se conocen comúnmente como tiras reactivas de flujo lateral. Emplean un material poroso, por ejemplo, nitrocelulosa, que define una trayectoria para el flujo de fluido capaz de soportar el flujo capilar. Los ejemplos incluyen los mostrados en las Patentes de Estados Unidos N° 5.559.041, 5.714.389, 5.120.643 y 6.228..

Otro tipo de dispositivo de ensayo es un dispositivo de ensayo no poroso que tiene proyecciones para inducir el flujo capilar. Ejemplos de tales dispositivos de ensayo incluyen el dispositivo de flujo lateral abierto como se divulga en las Publicaciones Internacionales de PCT N° WO 2003/103835, WO 2005/089082, WO 2005/118139 y WO 2006/137785.

En un dispositivo de ensayo no poroso, el dispositivo de ensayo generalmente tiene por lo menos una zona de adición de muestra, por lo menos una zona de conjugado, por lo menos una zona de reacción, y por lo menos una zona de adsorción. Las zonas forman una trayectoria de flujo por la cual la muestra fluye desde la zona de adición de muestra a la zona de absorción. También se incluyen elementos de captura, como anticuerpos, en la zona de reacción, capaces de unirse al analito, opcionalmente depositados en el dispositivo (como mediante

recubrimiento); y un material conjugado marcado también capaz de participar en reacciones que permitirán la determinación de la concentración de analito, depositado sobre el dispositivo en la zona de conjugado, en donde el material conjugado marcado lleva un marcador para la detección en la zona de reacción. El material conjugado se disuelve a medida que la muestra fluye a través de la zona de conjugado formando una columna conjugada de material conjugado marcado disuelto y la muestra que fluye hacia abajo hacia la zona de reacción. A medida que la columna de conjugado fluye hacia la zona de reacción, el material conjugado será capturado por los elementos de captura, como a través de un complejo de material conjugado y analito (como en un ensayo "sándwich") o directamente (como en un ensayo "competitivo"). El material conjugado disuelto no unido se extenderá más allá de la zona de reacción hasta la por lo menos una zona de adsorción. Tales dispositivos pueden incluir proyecciones o micropilares en la trayectoria del flujo.

Un instrumento como el que se describe en las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos N° US20060289787A1 y US 20070231883A1 y las Patentes de Estados Unidos N° 7.416.700 y 6.139.800, es capaz de detectar el material conjugado unido en la zona de reacción. Los marcadores comunes incluyen colorantes fluorescentes que pueden ser detectados por instrumentos que excitan los colorantes fluorescentes e incorporan un detector capaz de detectar los colorantes fluorescentes.

INMUNOENSAYOS

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

El término "analito" se refiere a cualquier sustancia o grupo de sustancias, la presencia o cantidad de las cuales debe determinarse. Los analitos representativos de fármacos antipsicóticos incluyen, pero no están limitados a, risperidona, paliperidona, olanzapina, aripiprazol y quetiapina.

El término "compañero de unión competitivo" se refiere a una sustancia o grupo de sustancias, como las que se pueden emplear en un inmunoensayo competitivo, que se comportan de manera similar a un analito con respecto a la afinidad de unión a un anticuerpo. Los compañeros de unión competitivos representativos incluyen, pero no están limitados a, derivados de fármacos antipsicóticos y similares.

El término "detectar" cuando se usa con un analito se refiere a cualquier método cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo, así como a todos los demás métodos para determinar un analito en general, y un fármaco antipsicótico en particular. Por ejemplo, el anticuerpo puede usarse en un método que simplemente detecta la presencia o ausencia de un fármaco antipsicótico en una muestra, además de los métodos que proporcionan datos sobre la cantidad o concentración del fármaco antipsicótico en la muestra. Los términos "detectar", "determinar", "identificar" y similares se usan como sinónimos en la presente.

El anticuerpo puede usarse en un inmunoensayo competitivo en el que los anticuerpos que se unen al fármaco antipsicótico, o el fármaco o el compañero de unión competitivo del mismo, se unen a un soporte sólido (como la zona de reacción en un dispositivo de ensayo de flujo lateral) y el fármaco marcado o el compañero de unión competitivo del mismo, o un anticuerpo marcado, respectivamente, y una muestra derivada del huésped se pasa sobre el soporte sólido y la cantidad de marcador detectado unido al soporte sólido puede correlacionarse con una cantidad de fármaco en la muestra.

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

Debe entenderse que se contemplan para su uso de acuerdo con las realizaciones actualmente preferidas todas las formas de inmunoensayos que emplean anticuerpos, incluyendo ensayos en los que los anticuerpos se unen a fases sólidas y ensayos en los que los anticuerpos están en medios líquidos. Los métodos de inmunoensayos que pueden usarse para detectar analitos usando los anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, ensayos competitivos (limitados a reactivos) en los que el analito marcado (análogo del analito) y el analito en una muestra compiten por los anticuerpos y ensayos inmunométricos de un solo sitio en donde el anticuerpo está marcado; y similares.

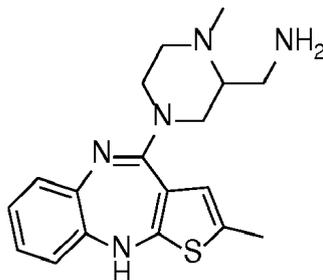
La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención en referencia a realizaciones específicas. Estas ejemplificaciones, aunque ilustran ciertos aspectos específicos de la invención, no representan las limitaciones ni circunscriben el

alcance de la invención descrita.

Todos los ejemplos se llevaron a cabo utilizando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto cuando se describe lo contrario en detalle. Las técnicas de biología molecular rutinarias de los siguientes ejemplos pueden llevarse a cabo como se describe en manuales de laboratorio estándar, como Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).

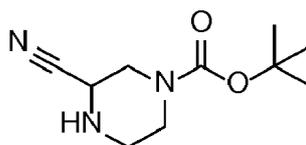
EJEMPLO 1

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



Paso A

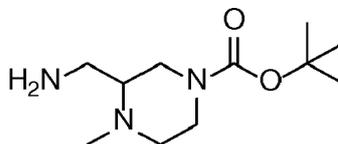
3-cianopiperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo



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

Paso B

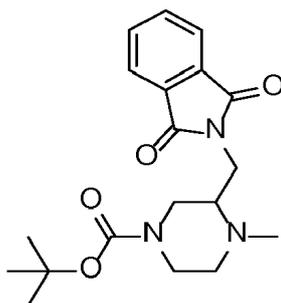
3-(aminometil)-4-metilpiperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo



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

Paso C

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



5

10

15

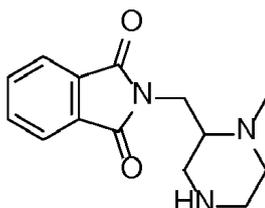
20

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

Paso D

25

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



30

35

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

40

Paso E

45

5-Metil-2-((2-nitrofenil)amino)tiofeno-3-carbonitrilo



50

55

60

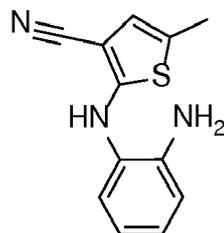
A una solución de 2-amino-5-metiltiofeno-3-carbonitrilo (13,8 g, 100 mmol) y 1-fluoro-2-nitrobenzoceno (16,92 g, 120 mmol) en dimetilsulfóxido se le añadió hidróxido de potasio (11,2 g, 200 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con agua y la suspensión resultante se filtró. La torta filtrada se secó para dar 5-metil-2-((2-nitrofenil)amino)tiofeno-3-carbonitrilo como un sólido rojo usado sin purificación adicional. $^1\text{H NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δ 9.69 (s, 1H), 8.27-8.25 (m, 1H), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.23-7.20 (m, 1H), 7.0-6.96 (m, 1H), 6.80 (s, 1H), 2.49 (s, 3H).

65

Paso F

2-((2-Aminofenil)amino)-5-metiltiofeno-3-carbonitrilo

5



10

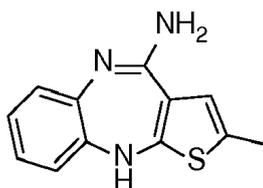
A una solución de 5-metil-2-((2-nitrofenil)amino)tiofeno-3-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (43,3 g, 0,157 mol) en acetato de etilo (500 ml) se añadió 10% de paladio sobre carbono (8 g). La mezcla negra se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de gas hidrógeno. Cuando la LCMS mostró que la mayor parte del 5-metil-2-((2-nitrofenil)amino)tiofeno-3-carbonitrilo se había consumido completamente, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar 2-((2-aminofenil)amino)-5-metiltiofeno-3-carbonitrilo. $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.29-7.21 (m, 1H), 7.11-7.10 (m, 1H), 6.86-6.79 (m, 2H), 6.48-6.47 (m, 1H), 6.42 (brs, 1H), 3.75-3.70 (br, 2H), 2.28 (s, 3H).

20

Paso G

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

25



30

Una mezcla de 2-((2-aminofenil)amino)-5-metiltiofeno-3-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (22,9 g, 100 mmol) en isopropanol (150 ml) y ácido clorhídrico acuoso (50 ml, 18%) se calentó a 80° C durante 3 h. La suspensión resultante se filtró y la torta del filtro se secó para dar el compuesto del título en forma de un sólido rojo. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz CDCl_3) δ 7.14-7.12 (t, 1H), 7.7.12-7.10 (t, 1H), 6.95-6.93 (d, $J = 8$ MHz, 1H), 6.81-6.79 (d, $J = 8$ MHz, 1H), 6.70 (s, 1H), 2.30 (s, 3H).

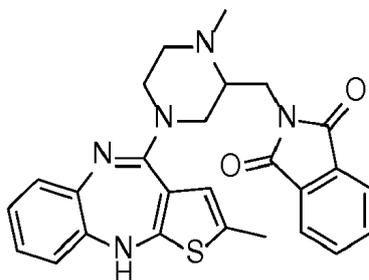
35

Paso H

40

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

45



50

Una solución de 2-((1-metilpiperazin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona, preparada como se describe en el paso D, (100 mg, 0,38 mmol), 2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-amina, preparada como se describe en el paso G, (150 mg, 0,52 mmol) y diisopropiletilamina (0,49 g, 3,8 mmol) en dimetilsulfóxido (0,5 ml) se agitó a 170° C durante 2 hrs. La reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se concentró y el residuo se purificó por columna para dar 15 mg de 2-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metil)isoindolina-1,3-diona. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76-7.73 (m, 1H), 7.45-7.35 (m, 3H), 7.18-7.17 (m, 1H), 6.98-6.95 (m, 2H), 6.75-6.73 (m, 1H), 6.46 (s, 1H), 4.28-4.25 (m, 1H), 3.96-6.92 (m, 1H), 3.71-3.64 (m, 3H), 3.47-3.41 (m, 1H), 3.29-3.28 (m, 1H), 3.12-3.09 (m, 1H), 2.87-2.86 (m, 1H), 2.67-2.53 (m, 3H), 2.28 (s, 3H).

55

60

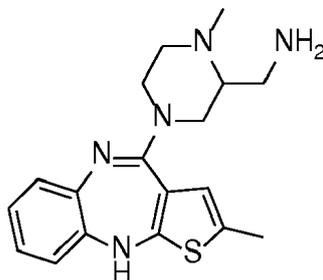
Paso I

65

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

5

10



Una solución de 2-((1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metilo)isoindolina-1,3-diona, preparada como se describe en el paso anterior, (1,0 g) en metilamina etanólica (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó por HPLC para dar la sal de clorhidrato de (1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepina-4-il)piperazin-2-il)metanamina como un sólido rojo. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 7.46-7.44 (m, 1H), 7.31-7.48 (m, 1H), 7.19-7.15 (m, 1H), 6.97-6.95 (m, 1H), 6.74 (s, 1H), 4.80-4.71 (br, 1H), 4.28-4.20 (br, 2H), 4.07-4.04 (br, 2H), 3.82-3.70 (br, 3H), 3.53-3.48 (m, 1H), 3.18 (s, 3H), 2.42 (m, 3H); ESI-MS (M+1): 342 calculado para C₁₈H₂₃N₅S Masa Exacta: 341.17.

20

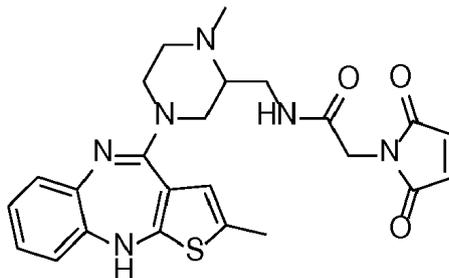
EJEMPLO 2

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

25

30

35



A una solución de (1-metil-4-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-4-il)piperazin-2-il)metanamina, preparada como se describe en el Ejemplo 1, (10,3 mg, 30,2 μmoles) en 570 μl de DMF y 13,3 μl de tributilamina se le añadieron 760 μl de una solución de DMF de éster de N-(α -maleimidoacetoxi)succinimida (AMAS, 10 mg/ml, 7m6 mg, 30,2 μmoles). La solución resultante se dejó agitar durante 18 horas a 20° C, luego se usó como tal en las reacciones de conjugación con proteína activada por tiol.

40

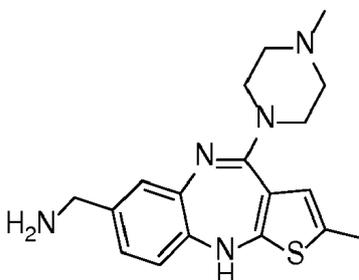
EJEMPLO 3

45

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

50

55

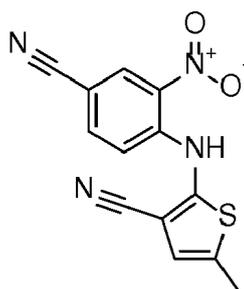


Paso A

60

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

65



5

10

15

20

A una suspensión de hidruro de sodio (60%, 0,58 g) en THF (2 ml), se le añadió 4-fluoro-3-nitro-benzonitrilo (1,33 g, 8,0 mmol) y 2-amino-5-metil-tiofeno-3-carbonitrilo (1,10 g, 8,0 mmol) en THF (10 ml), gota a gota. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. Se agregaron dos lotes más de hidruro de sodio (60%, 0,50 g y 0,4 g) durante las siguientes 6 horas. Después de agitar durante 3 días, la mezcla se vertió en agua con hielo (20 ml) y se acidificó a pH 3 con ácido clorhídrico 6N (7 ml). El precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido se extrajo con diclorometano (35 ml). La solución se concentró a un sólido y se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. LC-MS: m/z 285 (M+1), 307 (M+23). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 9.76 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.70 (d, 1H), 7.14 (d, 1H), 6.87 (s, 1H), 2.52 (s, 1H).

Paso B

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

25



30

35

A una suspensión de 2-(4-ciano-2-nitro-fenil-amino)-5-metil-tiofeno-3-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (0,52 g) en etanol (5 ml), se le añadió cloruro de estaño (1,36 g, 7,2 mmol) en HCl 6N. La mezcla se calentó en un baño de aceite a 85° C durante 3 horas y luego se enfrió en un baño de hielo. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó hasta obtener el compuesto del título como un sólido marrón que contiene sal inorgánica, que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. LC-MS: m/z 255 (M+1 of free base). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 11.18 (br, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.35 (br, 1H), 8.94 (br, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.95 (d, 1H), 2.26 (s, 3H).

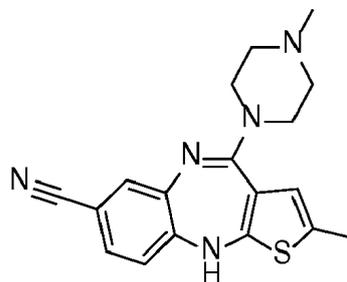
40

Paso C

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

45

50



55

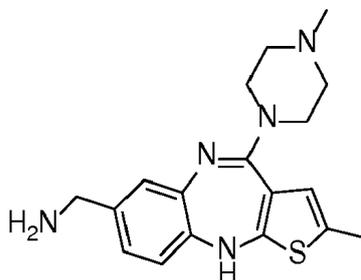
60

A una solución de clorhidrato de 10-amino-2-metil-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azuleno-7-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior, (0,6 g) en DMSO (6 ml) y tolueno (6 ml), se añadió 1-metilpiperazina (4 ml). La mezcla se calentó en un baño de aceite a 130° C durante 17 horas. La solución se concentró, se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó con agua (20 ml) y salmuera (20 ml) y luego se concentró. El sólido se disolvió en diclorometano (10 ml) y se trató con una solución de bicarbonato de sodio saturada. El compuesto del título se recogió como un precipitado amarillo claro, se lavó con agua y diclorometano, se secó y se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. LC-MS: m/z 338 (M+1). ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) 7.19-7.15 (m, 2H), 6.74 (d, 1H), 6.37 (s, 1H), 3.51 (m, 4H), 2.53 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

65

Paso D

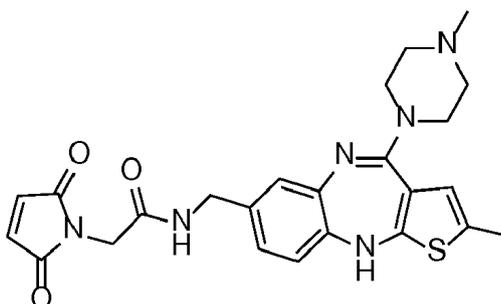
(2-Metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metanamina



A una solución de 2-metil-10-(4-metil-piperazin-1-il)-4H-3-tia-4,9-diaza-benzo[f]azuleno-7-carbonitrilo, preparada como se describe en el paso anterior (0,25 g) en metanol (90 ml) se le añadió HCl concentrado (0,4 ml) y negro de Pd (57 mg). La hidrogenación se llevó a cabo a 50 psi durante 1 h. Se añadió más negro de Pd (147 mg). La mezcla se agitó a 50 psi durante 22 h. El catalizador se filtró y se lavó con metanol. El filtrado se concentró, se trató con una solución de bicarbonato de sodio saturada (5 ml) y se concentró hasta la sequedad. El producto se purificó por columna de sílice. LC-MS: m/z 342 (M+1). ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) 6.89-6.85 (m, 2H), 6.64 (d, 1H), 6.34 (d, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.46 (m, 4H), 2.54 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.30 (d, 3H).

EJEMPLO 4

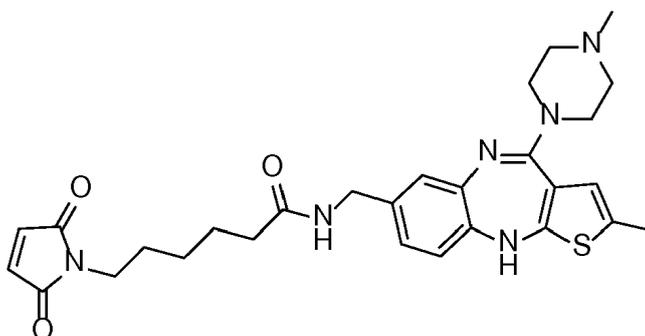
2-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metil)acetamida



A una solución de (2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4]diazepin-7-il)metanamina, preparada como se describe en el Ejemplo 3, (3,5 mg, 10,2 μmoles) en 185 μl de DMF y 4,5 μl de tributilamina se añadieron 260 μl de una solución de DMF de éster de N-(α-maleimidoacetoxi)succinimida (AMAS, 10 mg/ml, 216 mg, 1012 μmoles). La solución resultante se dejó agitar durante 90 minutos a 20° C, luego se usó como tal en la reacción de conjugación con proteína activada por tiol.

EJEMPLO 5

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



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

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

5

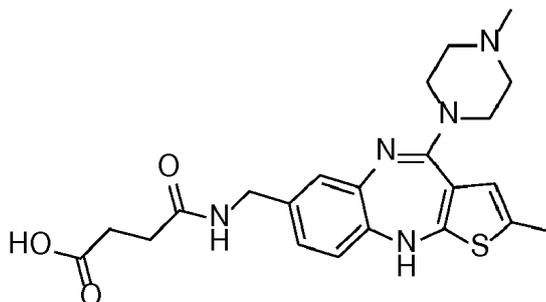
EJEMPLO 6

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

10

15

20

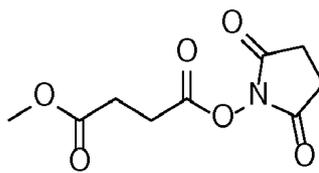


Paso A

25

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

30



35

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

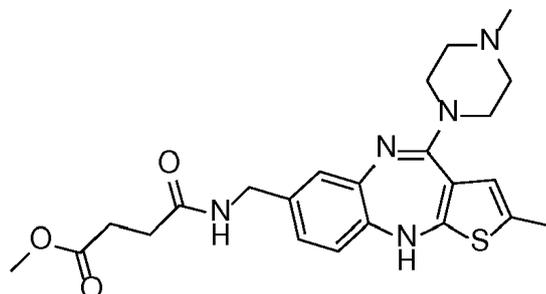
40

Paso B

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

45

50



55

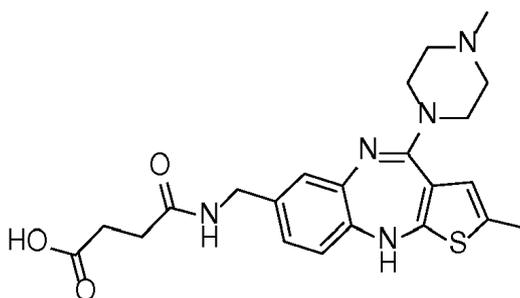
60

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

Paso C

65

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



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

EJEMPLO 7

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

Paso A

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

Paso B

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

EJEMPLO 8

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

Paso A

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

Paso B

Al BTG-SH, preparado como se describe en el paso anterior, (4,73 ml, 14,3 mg, 0,022 μ moles) se añadió una alícuota de la solución preparada en el Ejemplo 2, (969,6 μ l, 2117 μ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,45 μ m, luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

EJEMPLO 9

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

Paso A

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

Paso B

A la ovoalbúmina-SH, preparada como se describe en el paso anterior, (4.2 ml, 8,0 mg, 0,18 μ moles) se le añadió una alícuota de la solución preparada en el Ejemplo 2, (200 μ l, 4,5 μ moles). La mezcla resultante se incubó durante 3 horas a 20° C en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

EJEMPLO 10

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

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

EJEMPLO 11

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

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

EJEMPLO 12

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

Paso A

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

Paso B

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

Ejemplo 13

Inmunoensayos competitivos para Olanzapina e Inmunoensayo Competitivo Multiplex para Aripiprazol, Olanzapina, Quetiapina y Risperidona/Paliperidona

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

La Fig. 8 muestra el diseño de chip de un dispositivo de ensayo de flujo lateral. El dispositivo incluye una zona o área para recibir la muestra, una zona de conjugado (que contiene compañeros de unión competitivos marcados deseados) y una zona de reacción (se indican ocho áreas dentro de la zona de reacción; cada área puede contener un anticuerpo deseado separado). La muestra fluye desde la zona de muestra a través de la zona de conjugado y hacia la zona de reacción.

Las Figs. 9-12 muestran las curvas de respuesta a la dosis típicas para un control positivo de aripiprazol (muestra que contiene aripiprazol) generado con el anticuerpo 5C7 depositado en la zona de reacción 2 y un compañero de unión competitivo del aripiprazol marcado en la zona de conjugado (Fig. 9), un control positivo de olanzapina (muestra que contiene olanzapina) generada con el anticuerpo 4G9-1 depositado en la zona de reacción 4 y un compañero de unión competitivo de la olanzapina marcado en la zona de conjugado (Fig. 10), un control de quetiapina positivo (muestra que contiene quetiapina) generado con el anticuerpo 11 depositado en la zona de reacción 6 y un compañero de unión competitivo de la quetiapina marcado en la zona de conjugado (Fig. 11), y un control positivo de risperidona (muestra que contiene risperidona) generado con el anticuerpo 5-9 depositado en la zona de reacción 8 y un compañero de unión competitivo de la risperidona marcado en la zona conjugada (Fig. 12). Los compañeros de unión competitivos marcados en la zona de conjugado compiten con los fármacos presentes en las muestras para unirse a los anticuerpos. Se detecta la cantidad de marcador y es una indicación de la cantidad de fármaco presente en la muestra (la cantidad de señal siendo inversamente proporcional a la cantidad de fármaco en la muestra - ver Fig. 4).

Para confirmar que los conjugados de compañeros de unión competitivos marcados no se unen a los anticuerpos depositados en las zonas de reacción, se realizaron controles negativos usando muestras que no contenían fármacos. Con referencia a la Tabla 10, una muestra que no contiene aripiprazol se deposita en la zona de la muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada, pero no aripiprazol marcado) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2. La Tabla 10 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis y que los conjugados de olanzapina, quetiapina y risperidona que se mueven por acción capilar a través de la zona de reacción no se unen al anticuerpo de aripiprazol.

Tabla 10

Aripiprazol-Clon 5C7-Modelo Mat 1 (0ng/ml Conc.)						
Ensayo-MM	Conj	Zona de Reacción	Posición de Lectura	Area Media del Pico	Altura Media del Pico	Fondo Medio
ARIP-MM1	OLAN, QUET, RISP	ARIP	2	0.77	1.56	3.99
ARIP-MM1	OLAN, QUET, RISP		4	-0.02	0.06	4.14
ARIP-MM1	OLAN, QUET, RISP		6	0.09	0.10	4.29
ARIP-MM1	OLAN, QUET, RISP		8	0.13	0.12	4.61
Otros Conjugados no se unen al Aripiprazol						

Con referencia a la Tabla 11, una muestra que no contiene olanzapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, quetiapina marcada y risperidona marcada, pero no olanzapina marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4. La Tabla 11 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis y que los conjugados de aripiprazol, quetiapina y risperidona que se mueven por acción capilar a través de la zona de reacción no se unen al anticuerpo de olanzapina.

Tabla 11

OLAN-Clon 4G9-1Modelo Mat. 1 (0ng/ml Conc.)						
Ensayo-MM	Conj	Zona de Reacción	Posición de Lectura	Area Media del Pico	Altura Media del Pico	Fondo Medio
OLAN-MM1	ARIP,QUET,RISP		2	-0.03	0.05	4.38
OLAN-MM1	ARIP,QUET,RISP	OLAN	4	0.74	1.10	4.56
OLAN-MM1	ARIP,QUET,RISP		6	0.06	0.09	4.79
OLAN-MM1	ARIP,QUET,RISP		8	0.11	0.13	5.17
Otros Conjugados no se unen a la Olanzapina						

Con referencia a la Tabla 12, una muestra que no contiene quetiapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada y risperidona marcada, pero no quetiapina marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción de nuevo contiene el anticuerpo quetiapina (11) en la zona de reacción 6. La Tabla 12 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis y que los conjugados de aripiprazol, olanzapina y risperidona que se mueven por acción capilar a través de la zona de reacción no se unen al anticuerpo de quetiapina.

Tabla 12

Quetiapina-Clon 11-Modelo Mat 1 (0ng/ml Conc.)						
Ensayo MM	Conj	Zona de Reacción	Posición de Lectura	Area Media del Pico	Altura Media Del Pico	Fondo Medio
QUET-MM1	ARIP,OLAN,RISP		2	-0.01	0.07	3.85
QUET-MM1	ARIP,OLAN,RISP		4	0.01	0.12	4.01
QUET-MM1	ARIP,OLAN,RISP	QUET	6	0.03	0.08	4.24
QUET-MM1	ARIP,OLAN,RISP		8	0.04	0.07	4.56
Otros Conjugados no se unen a la Quetiapina						

Con referencia a la Tabla 13, una muestra que no contiene risperidona se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona conjugada (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada y quetiapina marcada, pero no risperidona marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de risperidona (5-9) en la zona de reacción 8. La Tabla 13 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis y que los conjugados de aripiprazol, olanzapina y quetiapina que se mueven por acción capilar a través de la zona de reacción no se unen al anticuerpo de risperidona.

Tabla 13

Risperidona-Clon 5-9-Modelo Mat 1 (0ng/ml Conc.)						
Ensayo-MM	Conj	Zona de Reacción	Posición de Lectura	Area Media del Pico	Altura Media del Pico	Fondo Medio
RISP-MM1	ARIP,OLAN, QUET		2	0.02	0.11	7.43
RISP-MM1	ARIP,OLAN, QUET		4	0.05	0.14	7.73
RISP-MM1	ARIP,OLAN, QUET		6	0.20	0.19	8.11
RISP-MM1	ARIP,OLAN, QUET	RISP	8	1.97	3.23	8.85
Otros Conjugados no se unen a la Risperidona						

Para confirmar que los conjugados de compañeros de unión competitivos marcados se unen solo a sus anticuerpos respectivos depositados en las zonas de reacción, se realizaron controles negativos adicionales usando de nuevo muestras que no contenían fármacos. Con referencia a la Tabla 14, una muestra que no contiene aripiprazol se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como el anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, el anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y el anticuerpo de risperidona (5-9) en la reacción zona 8. La tabla 14 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis, excepto para el anticuerpo 5C7 de aripiprazol (en la zona de reacción 2).

Tabla 14

Aripiprazol-Clon 5CT-Modelo Mat 1 (0ng/ml Conc.)						
Ensayo-MM	Conj	Zona de Reacción	Posición de Lectura	Area Media del Pico	Altura Media del Pico	Fondo Medio
ARIP-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP	ARIP	2	60.34	97.53	5.44
ARIP-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		4	2.86	3.91	11.66
ARIP-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		6	1.12	1.23	11.03
ARIP-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		8	3.14	4.19	12.94
Solo se une la Zona de Reacción de Aripiprazol						

Con referencia a la Tabla 15, una muestra que no contiene olanzapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo olanzapina marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como el anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, el anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y el anticuerpo de risperidona (5-9) en la reacción zona 8. La tabla 15 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis, excepto para el anticuerpo 4G9-1 de olanzapina (en la zona de reacción 4).

Tabla 15

OLAN-Clon 4G9-1-Modelo Mat 1 (0ng/ml Conc.)						
Ensayo-MM	Conj	Zona de Reacción	Posición de Lectura	Area Media del Pico	Altura Media del Pico	Fondo Medio
OLAN-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		2	0.02	0.08	4.86
OLAN-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP	OLAN	4	34.23	51.80	5.39
OLAN-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		6	0.22	0.32	5.39
OLAN-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		8	0.15	0.17	5.59
Solo se une la Zona de Reacción de Olanzapina						

Con referencia a la Tabla 16, una muestra que no contiene quetiapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo quetiapina marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como el anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, el anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y el anticuerpo de risperidona (5-9) en la reacción zona 8. La tabla 16 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis, excepto para el anticuerpo 11 de quetiapina (en la zona de reacción 6).

Tabla 16

Quetiapina-Clon 11-Modelo Mat 1 (0ng/ml Conc.)						
Ensayo-MM	Conj	Zona de Reacción	Posición de Lectura	Area Media del Pico	Altura Media del Pico	Fondo Medio
QUET-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		2	0.13	0.41	10.02
QUET-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		4	0.08	0.23	10.47
QUET-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP	QUET	6	140.35	181.33	7.91
QUET-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		8	1.58	2.61	11.53
Solo se une la Zona de Reacción de Quetiapina						

Con referencia a la Tabla 17, una muestra que no contiene risperidona se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona conjugada (esta vez conteniendo risperidona marcada) y a la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como el anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, el anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y el anticuerpo de risperidona (5-9) en la reacción zona 8. La tabla 17 siguiente muestra los resultados, confirmando que no hay respuesta a la dosis, excepto para el anticuerpo de risperidona 5-9 (en la zona de reacción 8).

Tabla 17

Risperidona-Clon 5-9-Modelo Mat 1 (0ng/ml Conc.)						
Ensayo-MM	Conj	Zona de Reacción	Posición de Lectura	Area Media del Pico	Altura Media del Pico	Fondo Medio
RISP-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		2	1.03	1.51	9.07
RISP-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		4	0.65	0.91	9.60
RISP-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP		6	2.61	6.39	10.48
RISP-MM1	ARIP,OLAN,QUET,RISP	RISP	8	55.98	100.91	11.58
Solo se une la Zona de Reacción de Risperidona						

Los resultados mostrados anteriormente confirman que los conjugados de compañeros de unión competitiva marcados se unen solo a sus respectivos anticuerpos en la zona de reacción.

Las Figs. 13-16 muestran las curvas de respuesta a la dosis típicas en zonas de reacción de anticuerpos específicos, y la prueba de concentración baja/alta de respuesta a la dosis para cada ensayo específico en presencia de otros conjugados. En la Fig. 13, una muestra que contiene aripiprazol se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene nuevamente el anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2. Se generó una curva de respuesta a la dosis típica, como se muestra en la Fig. 13 solo para aripiprazol, y no para olanzapina, quetiapina o risperidona.

En la Fig. 14, una muestra que contiene olanzapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4. Se generó una curva de respuesta a la dosis típica, como se muestra en la Fig. 14 solo para olanzapina, y no para aripiprazol, quetiapina o risperidona.

En la Fig. 15, una muestra que contiene quetiapina se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6. Se generó una curva de respuesta a la dosis típica, como se muestra en la Fig. 15 solo para quetiapina, y no para aripiprazol, olanzapina o risperidona.

En la Fig. 16, una muestra que contiene risperidona se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (esta vez conteniendo aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de risperidona (5-9) en la zona de reacción 8. Se generó una curva de respuesta a la dosis típica, como se muestra en la Fig. 16 solo para la risperidona, y no para aripiprazol, olanzapina o quetiapina.

Las Figs. 17-20 muestran curvas típicas de respuesta a la dosis para cada ensayo en presencia de otros conjugados y anticuerpos. En la Fig. 17, una muestra que contiene aripiprazol se deposita en la zona de muestra y se mueve por acción capilar a través de la zona de conjugado (que de nuevo contiene aripiprazol marcado, olanzapina marcada, quetiapina marcada y risperidona marcada) y hacia la zona de reacción. La zona de reacción contiene de nuevo el anticuerpo de aripiprazol (5C7) en la zona de reacción 2, así como el anticuerpo de olanzapina (4G9-1) en la zona de reacción 4, el anticuerpo de quetiapina (11) en la zona de reacción 6 y el anticuerpo de risperidona (5-9) en la reacción zona 8. Se generó una curva de respuesta a la dosis típica para el aripiprazol, como se muestra en la Fig. 17. Cuando una muestra que contenía olanzapina se depositó en la zona de muestra de este chip, se generó una curva de respuesta a la dosis típica para la olanzapina, como se muestra en la Fig. 18. Cuando se depositó una muestra que contenía quetiapina en la zona de muestra de este chip, se generó una curva de respuesta a la dosis típica para la quetiapina, como se muestra en la Fig. 19. Cuando se depositó una muestra que contenía risperidona en la zona de muestra de este chip, se generó una curva de respuesta a la dosis típica para la risperidona como se muestra en la Fig. 20.

Las Figs. 21-24 muestran comparaciones de curvas de respuesta a la dosis generadas como controles positivos (Figs. 9-12) para curvas de respuesta a la dosis generadas en el formato múltiplex (Figs. 17-20). La comparación para el aripiprazol se muestra en la Fig. 21; para la olanzapina en la Fig. 22; para la quetiapina en la Fig. 23; y para la risperidona en la Fig. 24. Estas figuras muestran que las curvas de control positivo son similares a las curvas múltiplex.

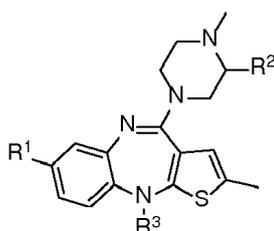
Estos datos demuestran puede usarse que un dispositivo de ensayo de flujo lateral para detectar múltiples fármacos antipsicóticos usando una muestra individual de un paciente en un dispositivo portátil de punto de atención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un anticuerpo que se une a la olanzapina, el método comprendiendo:

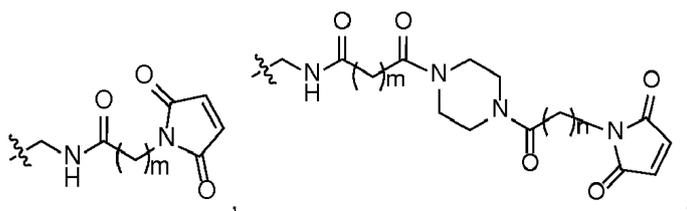
- 5 (i) seleccionar un huésped no humano para la producción de anticuerpos; y
 (ii) inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico, en donde el huésped produce un anticuerpo que se une a la olanzapina,

10 Fórmula I:

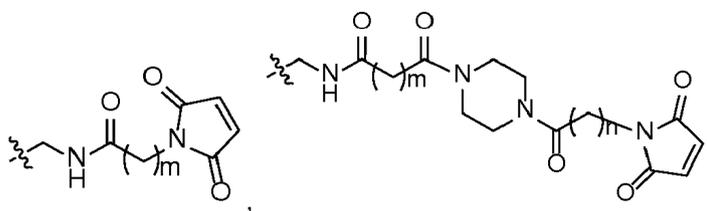


20 en donde:

R¹ es H,



25 CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
 R² es H,



35 CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;

45 R³ es H; con la condición de que o R¹ o R² deben ser H, y además con la condición de que tanto R¹ como R² pueden no ser H simultáneamente;

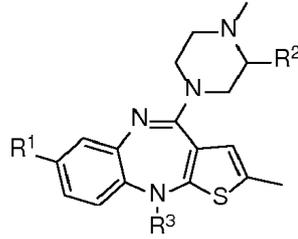
m es 1, 2, 3, 4 o 5; y

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

50 2. Un método para producir una línea celular de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal que se une a la olanzapina, el método comprendiendo:

- 55 (i) seleccionar un huésped para la producción de anticuerpos;
 (ii) inocular al huésped con un conjugado de un compuesto de Fórmula I y un portador inmunogénico;
 (iii) fusionar un linfocito de dicho huésped inoculado con una línea celular inmortalizada para crear una célula fusionada capaz de producir un anticuerpo monoclonal que se une a la olanzapina; y
 (iv) clonar la célula fusionada para obtener una línea celular de hibridoma,

Formula I:



5

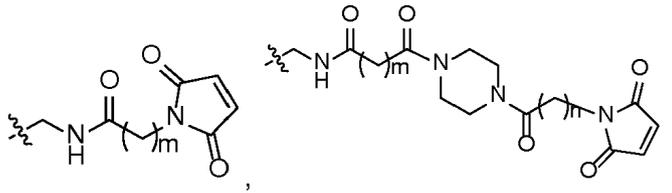
10

en donde:

R¹ es H,

15

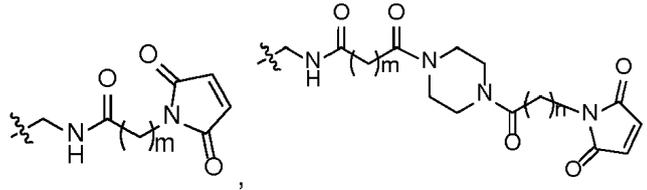
20



25

CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
R² es H,

30



35

CH₂NH₂, o CH₂NHC(O)(CH₂)_mCO₂H;
R³ es H; con la condición de que o R¹ o R² deben ser H, y además con la condición de que tanto R¹ como R² pueden no ser H simultáneamente;
m es 1, 2, 3, 4 o 5; y
n es 1, 2, 3, 4 o 5.

40

3. El método de la reivindicación 2, en el que la línea celular de hibridoma produce un anticuerpo monoclonal que se une a la olanzapina.

45

50

55

60

65

Fig. 1

**Competición Cloz/Olan
ratón 11.1**

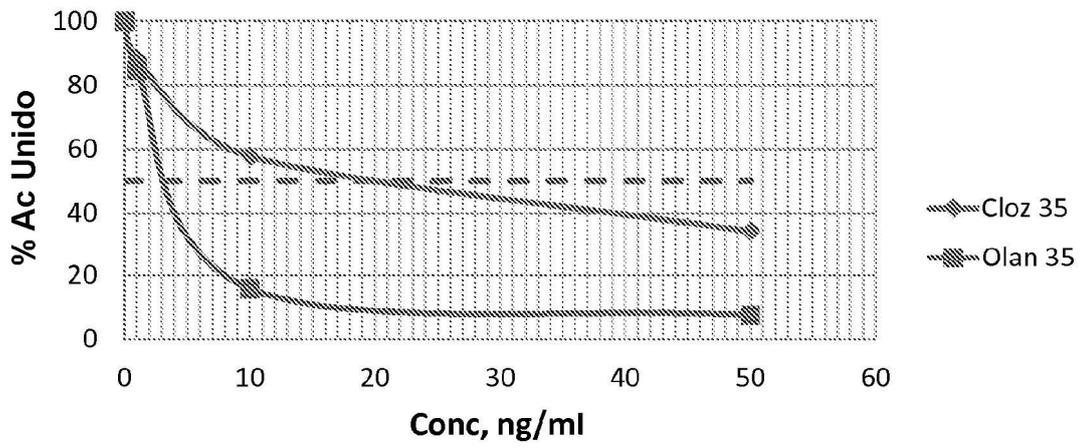


Fig. 2

**Competición Cloz/Olan
ratón 11.1**

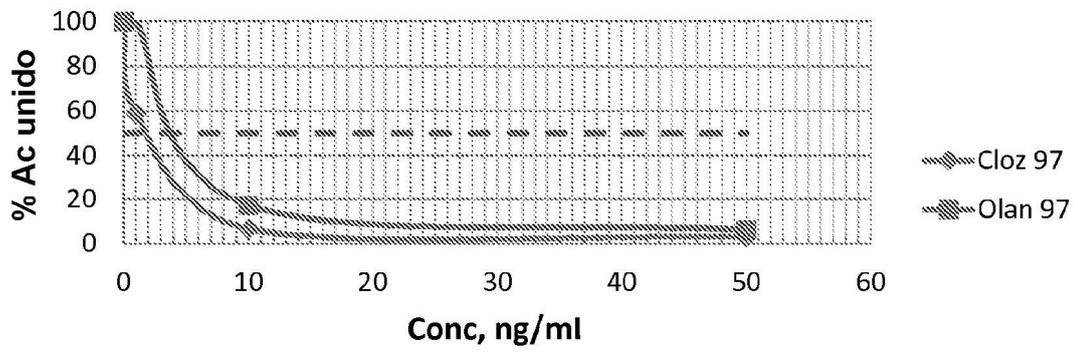


Fig. 3

**Competición Cloz/Olan
ratón 11.1**

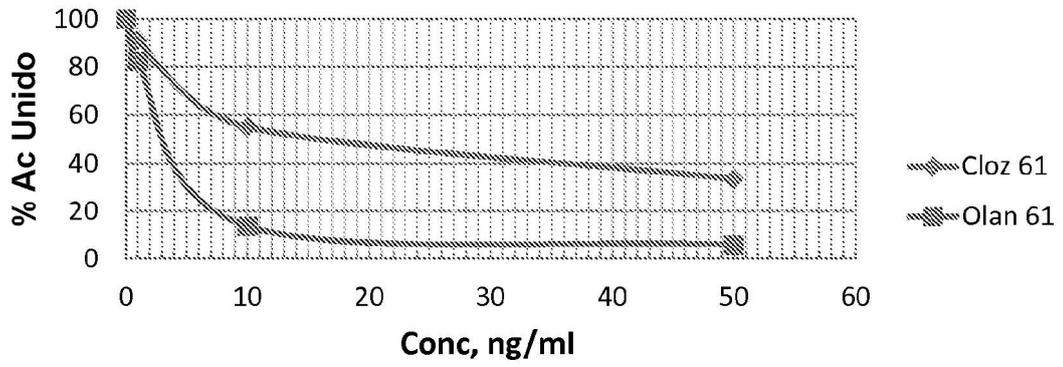


Fig. 4

Formatos Competitivos: AC Abajo

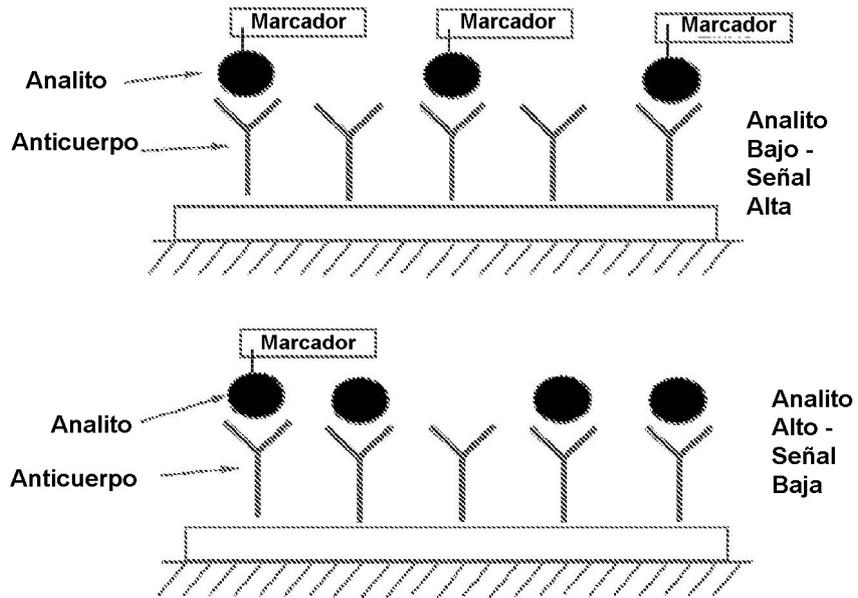


Fig. 5

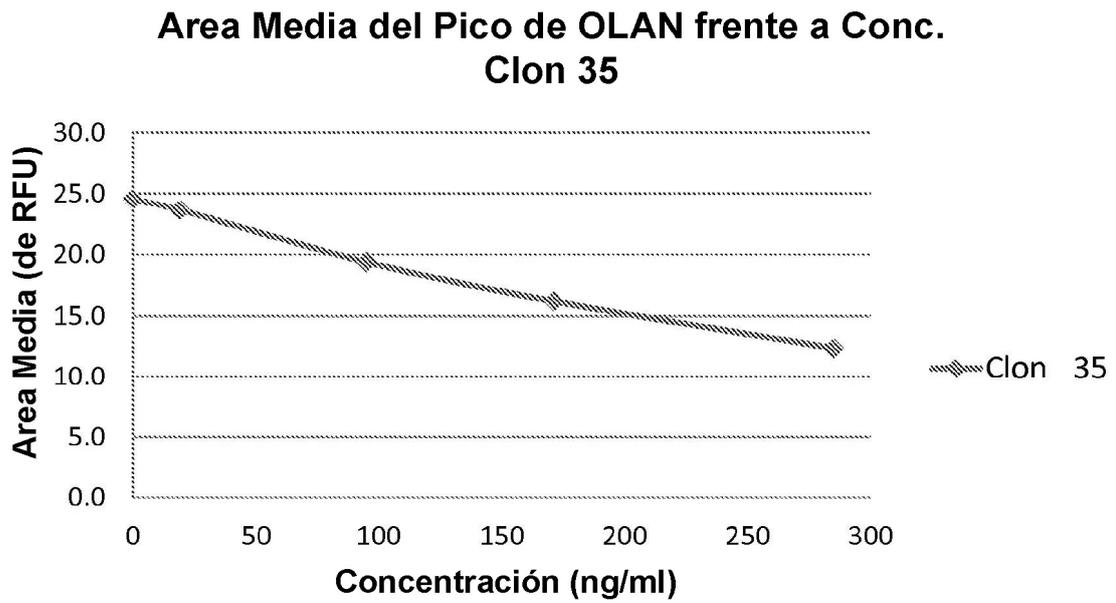


Fig. 6

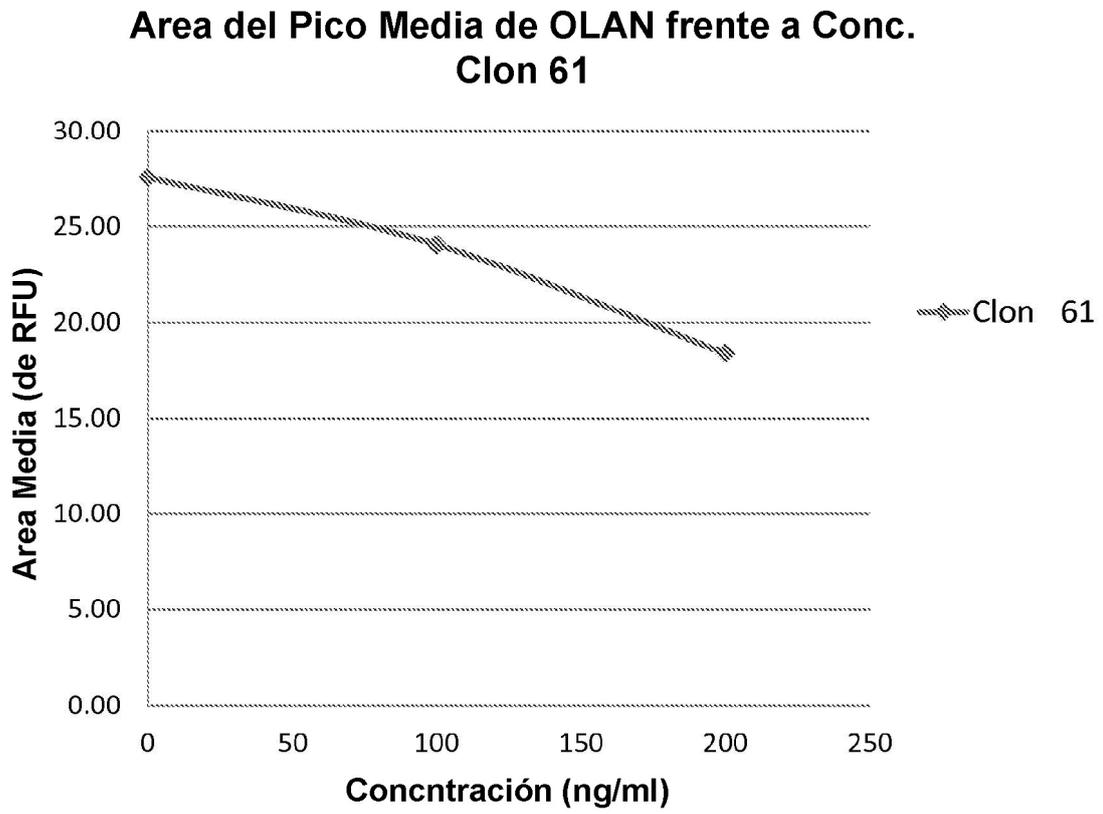


Fig. 7

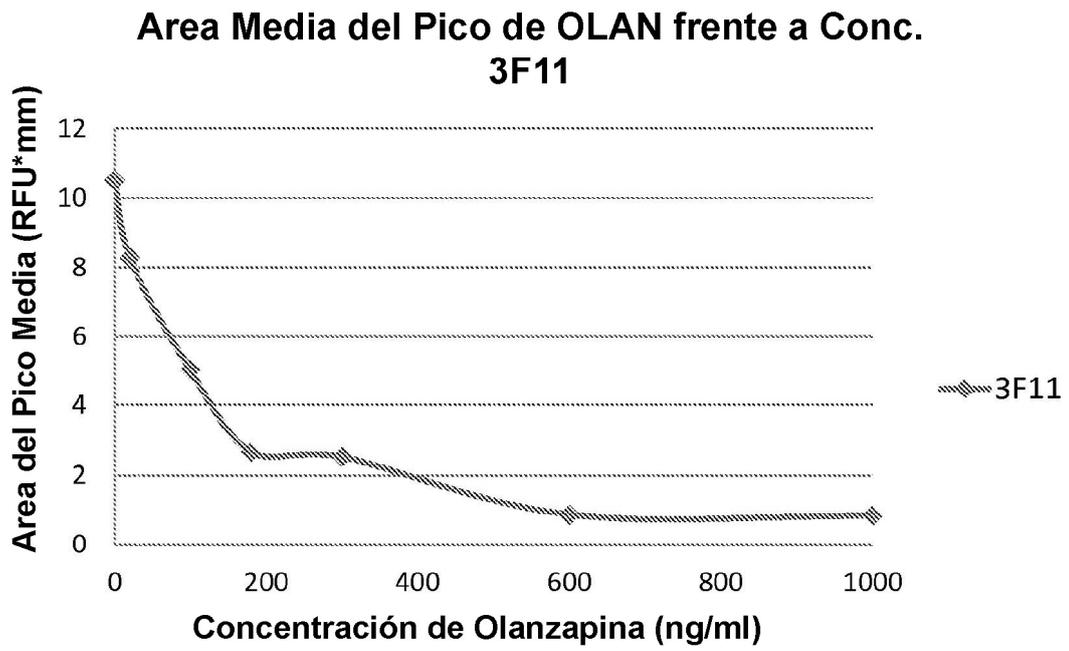


Fig. 8

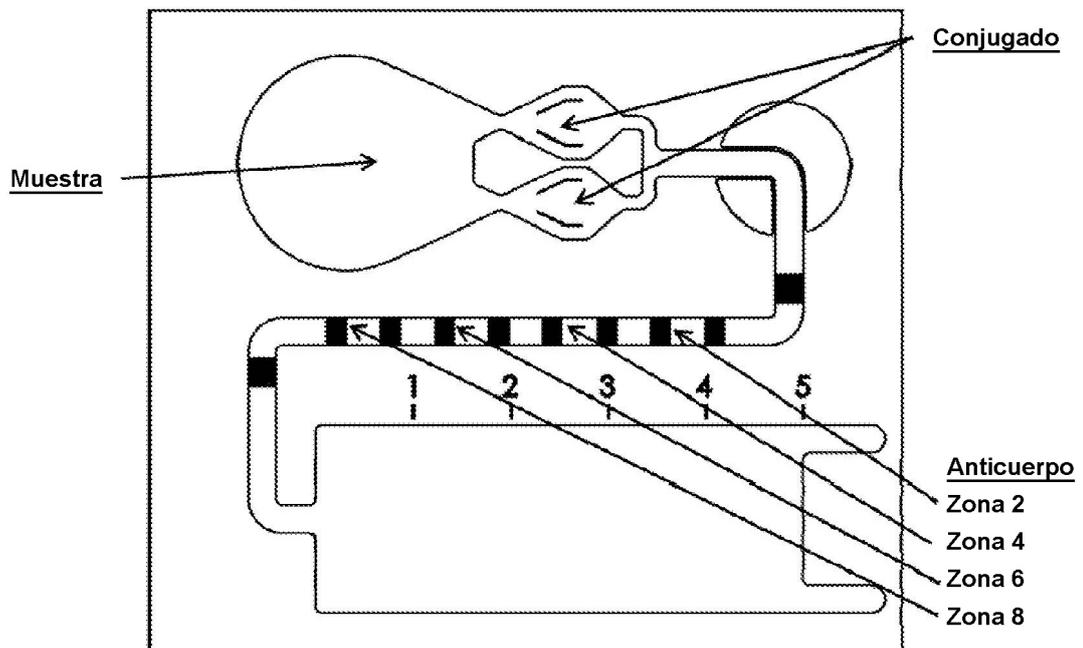


Fig. 9

**Area Media del Pico de ARIP frente a Conc.
Clon 5C7**

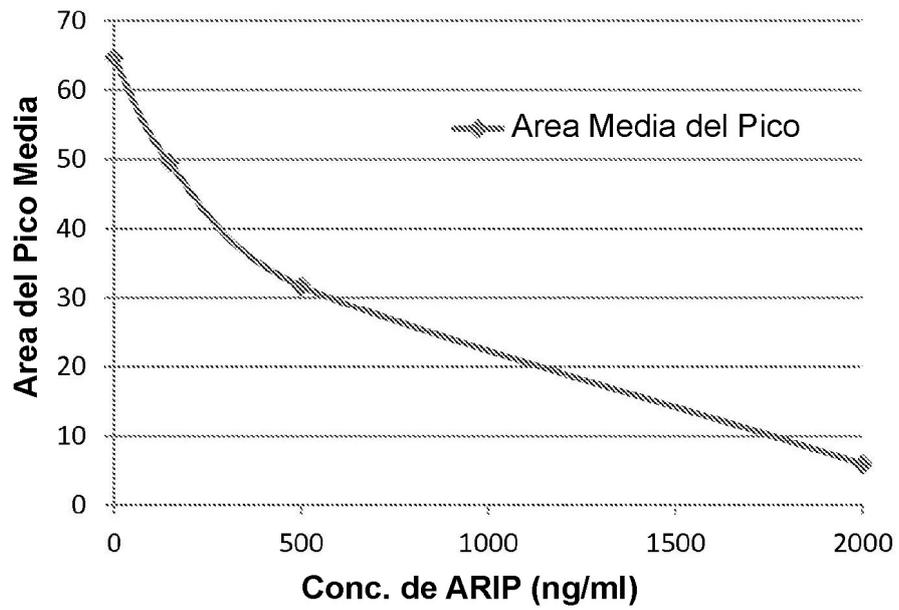


Fig. 10

**Area Media del Pico de OLAN frente a Conc.
Clon 4G9-1**

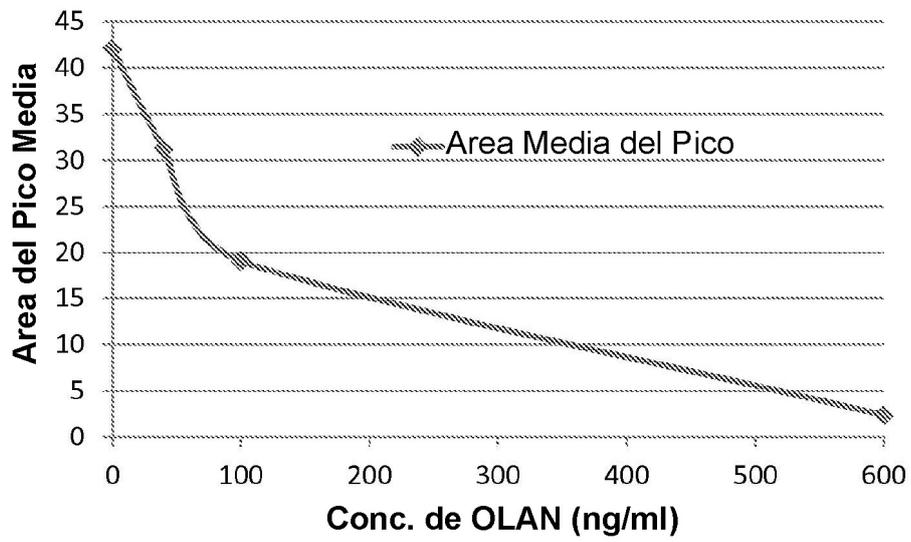


Fig. 11

**Area Media del Pico de QUET frente a Conc.
Clon 11**

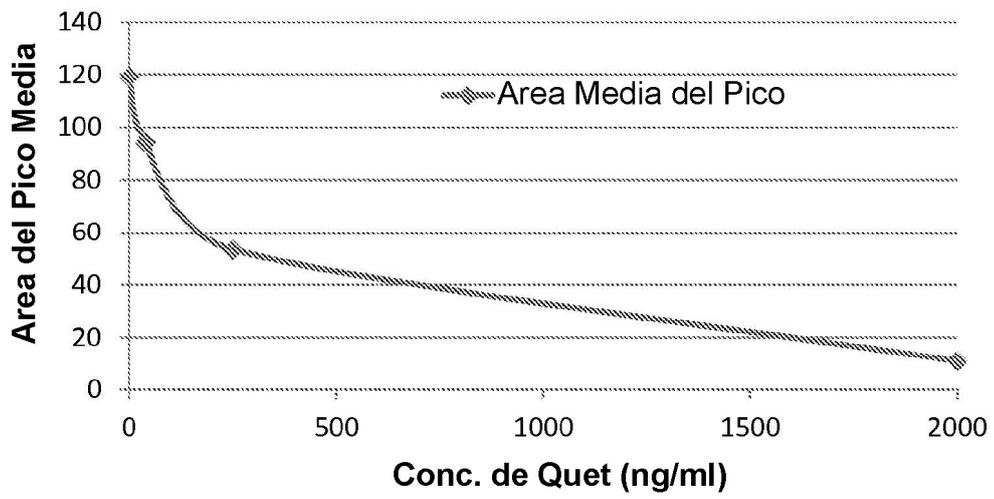


Fig. 12

**Area Media del Pico de RISP frente a Conc.
Clon 5-9**

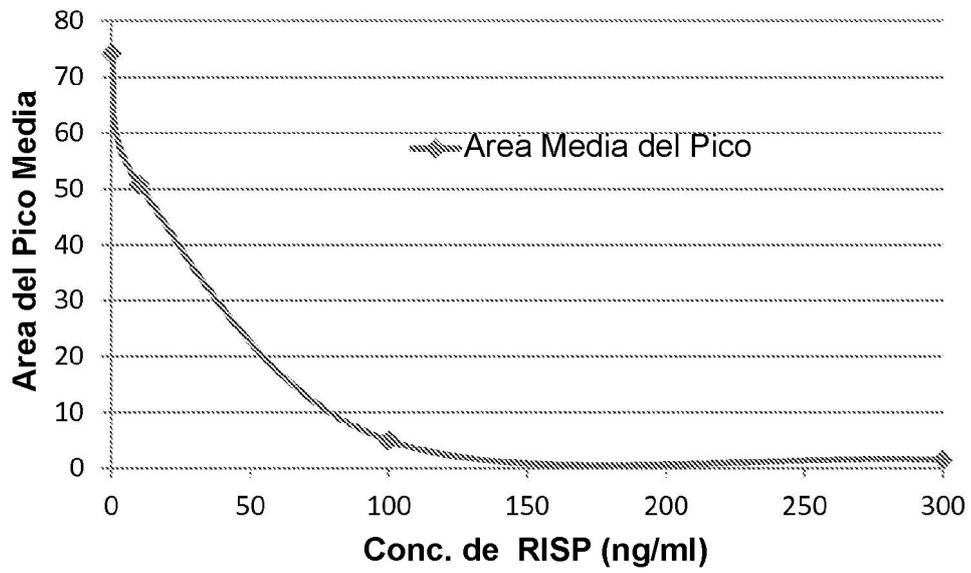


Fig. 13

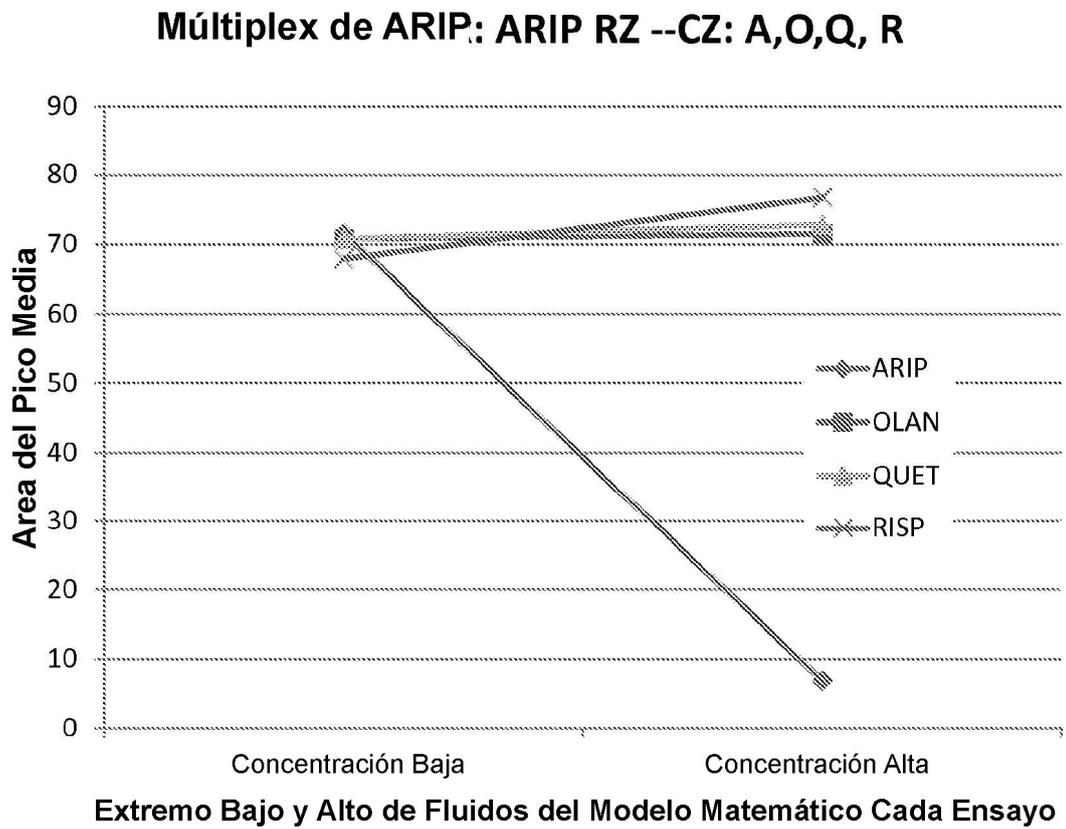


Fig. 14

Multiplex de OLAN : OLAN RZ--CZ: A,O,Q,R

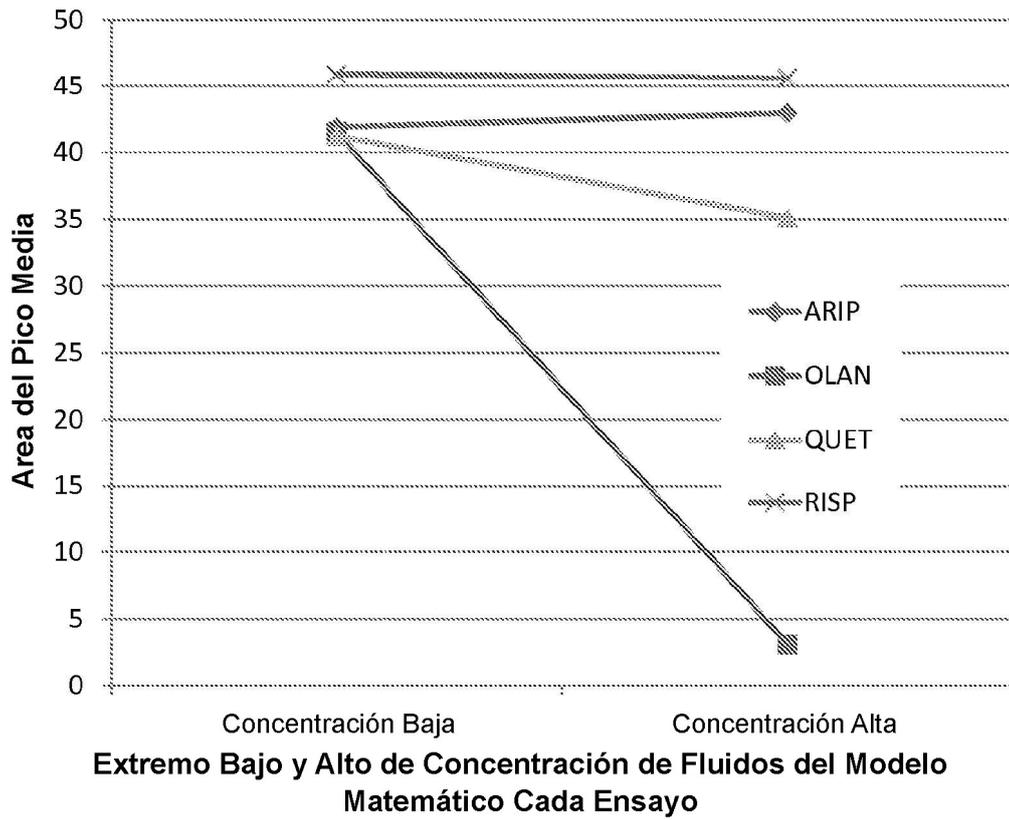


Fig. 15

Multiplex de QUET: QUET RZ--CZ: A,O,Q,R

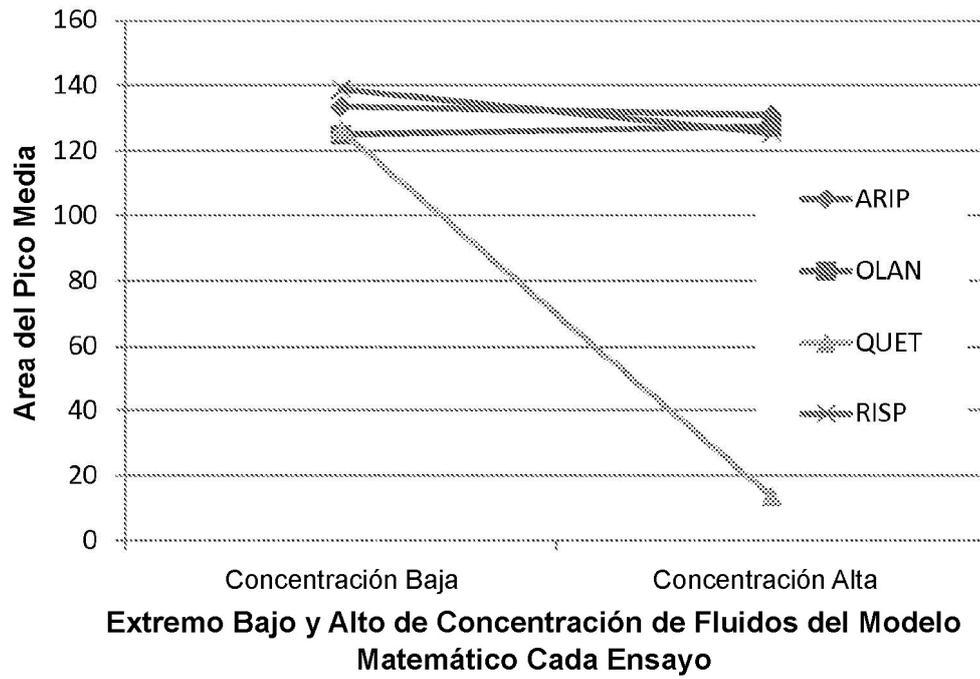
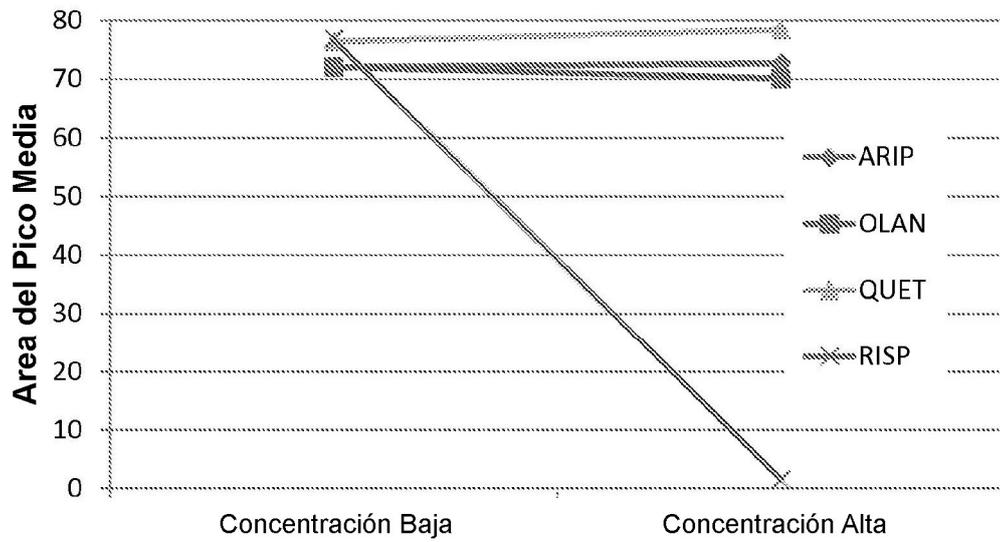


Fig. 16

Multiplex de RISP: RISP RZ--CZ: A,O,Q,R



Extremo Bajo y Alto de Concentración de Fluidos del Modelo Matemático Cada Ensayo

Fig. 17

ARIP: Multiplex Completo= RZ: A,O,Q,R-- CZ: A,O,Q,R

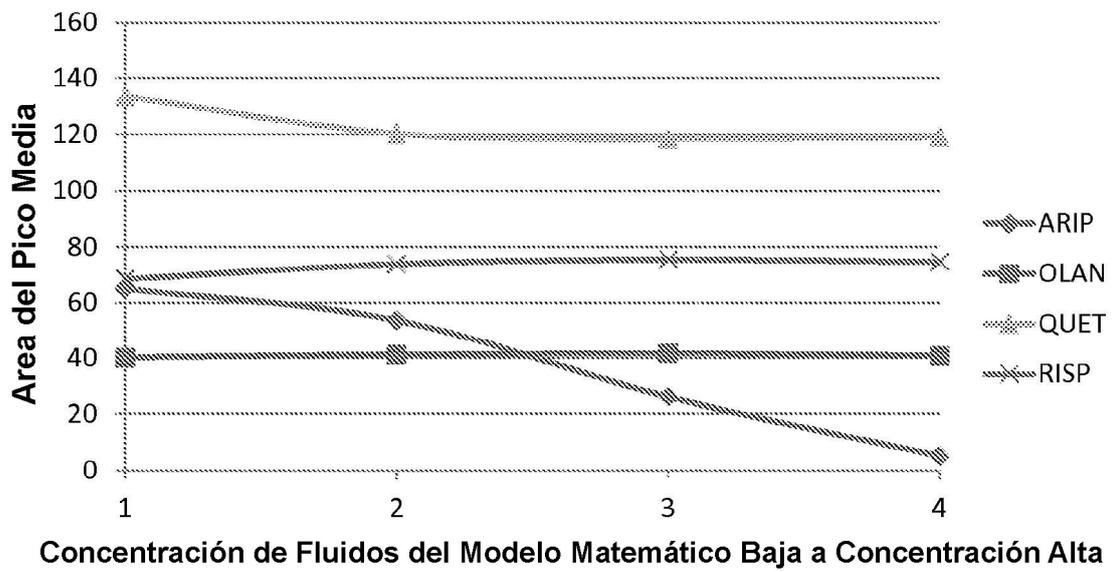


Fig. 18

**OLAN: Multiplex Completo= RZ: A,O,Q,R--CZ:
A,O,Q,R**

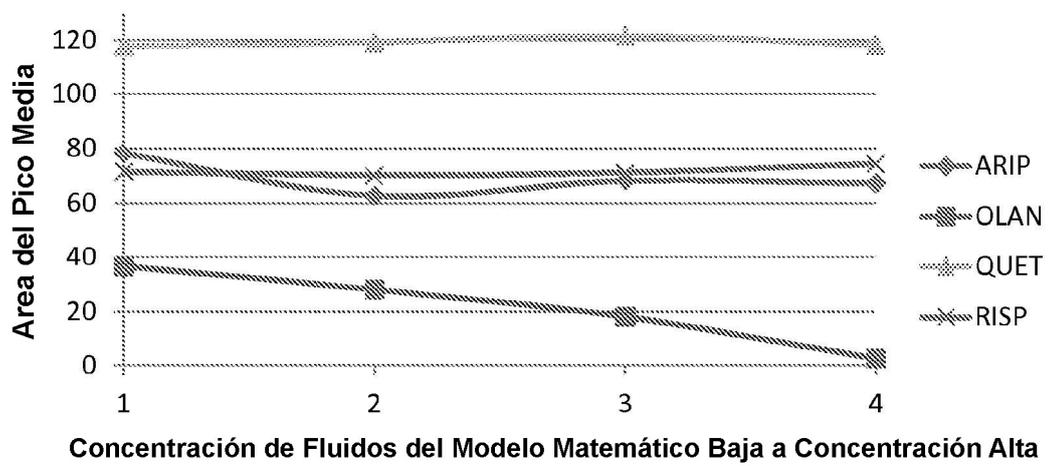


Fig. 19

QUET: Multiplex Completo=RZ: A,O,Q,R--CZ: A,O,Q,R

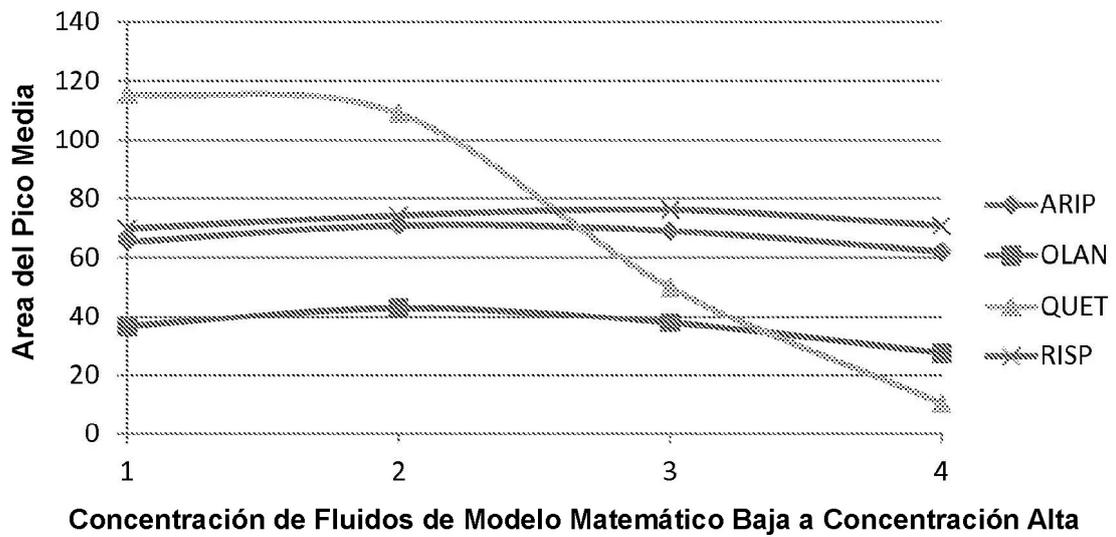


Fig. 20

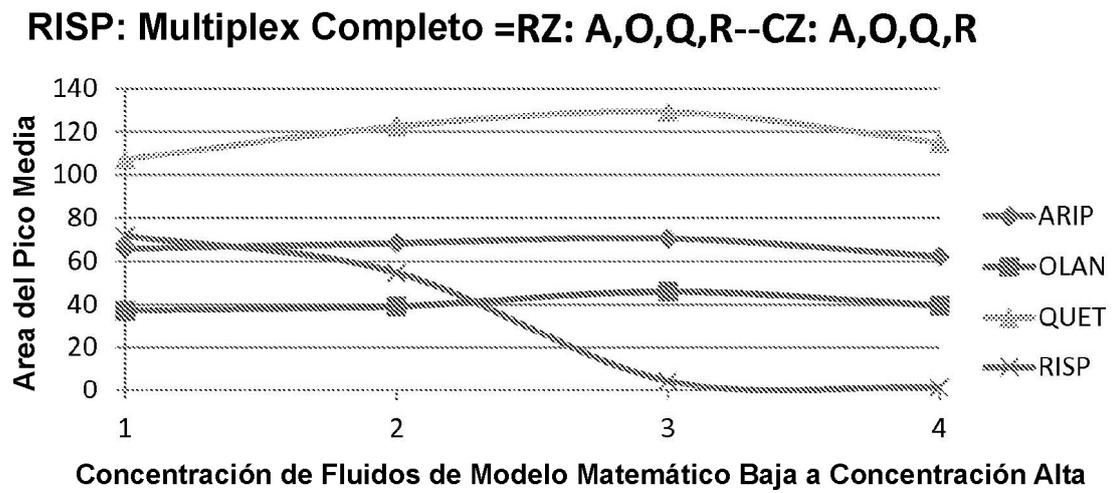


Fig. 21

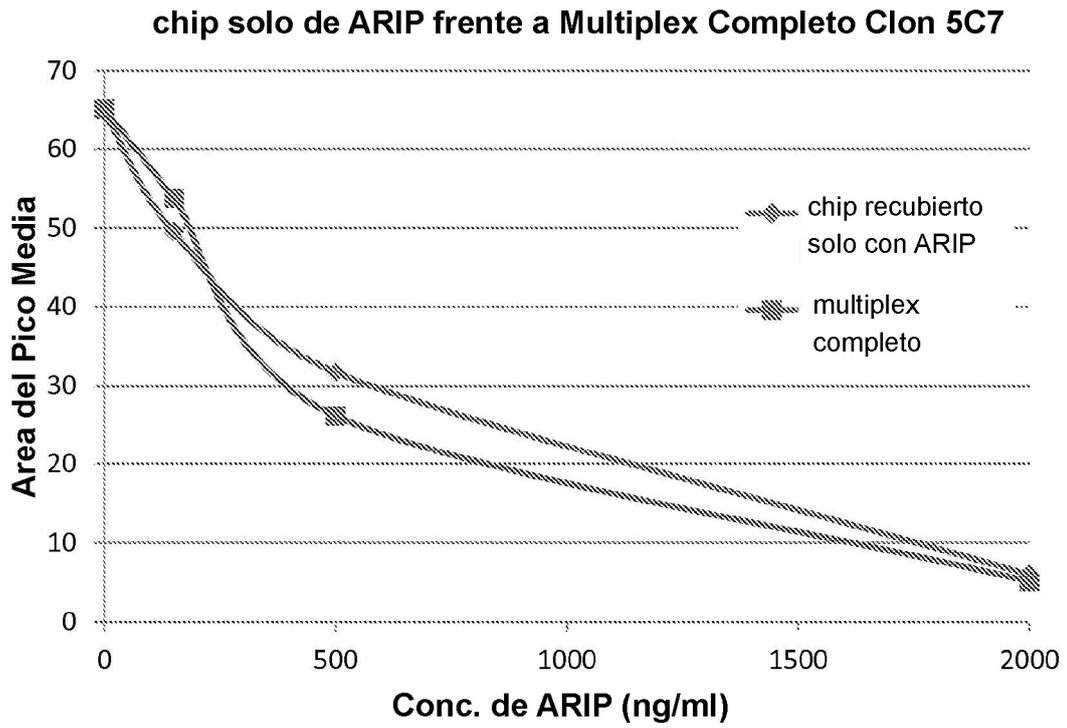


Fig. 22

chip solo de OLAN frente a Multiplex Completo 4G9-1

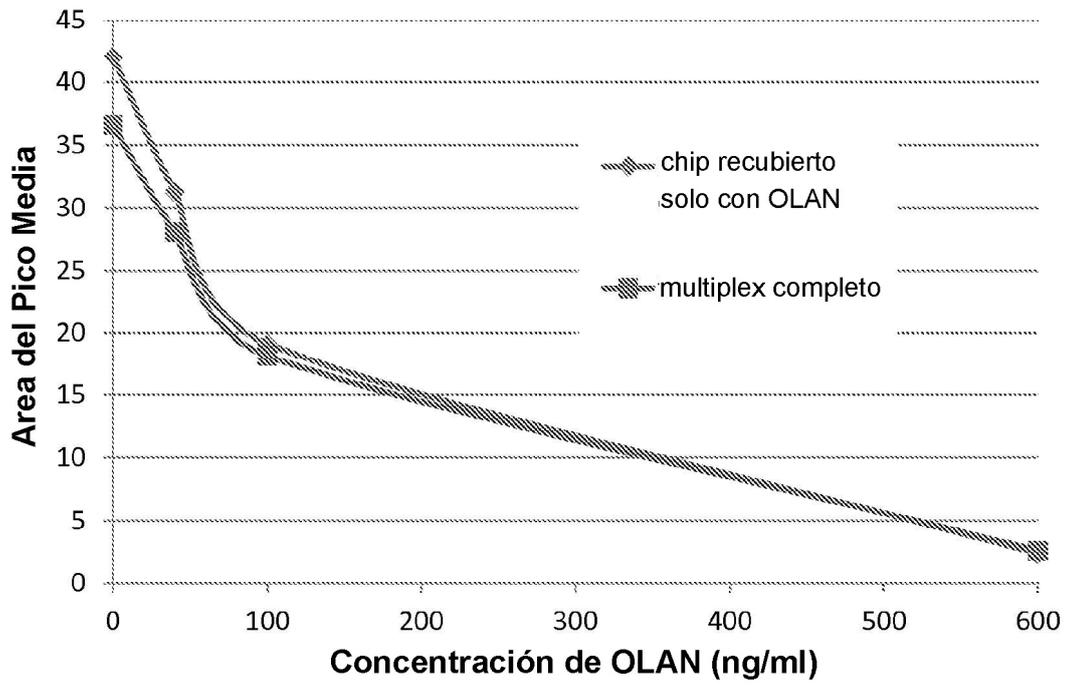


Fig. 23

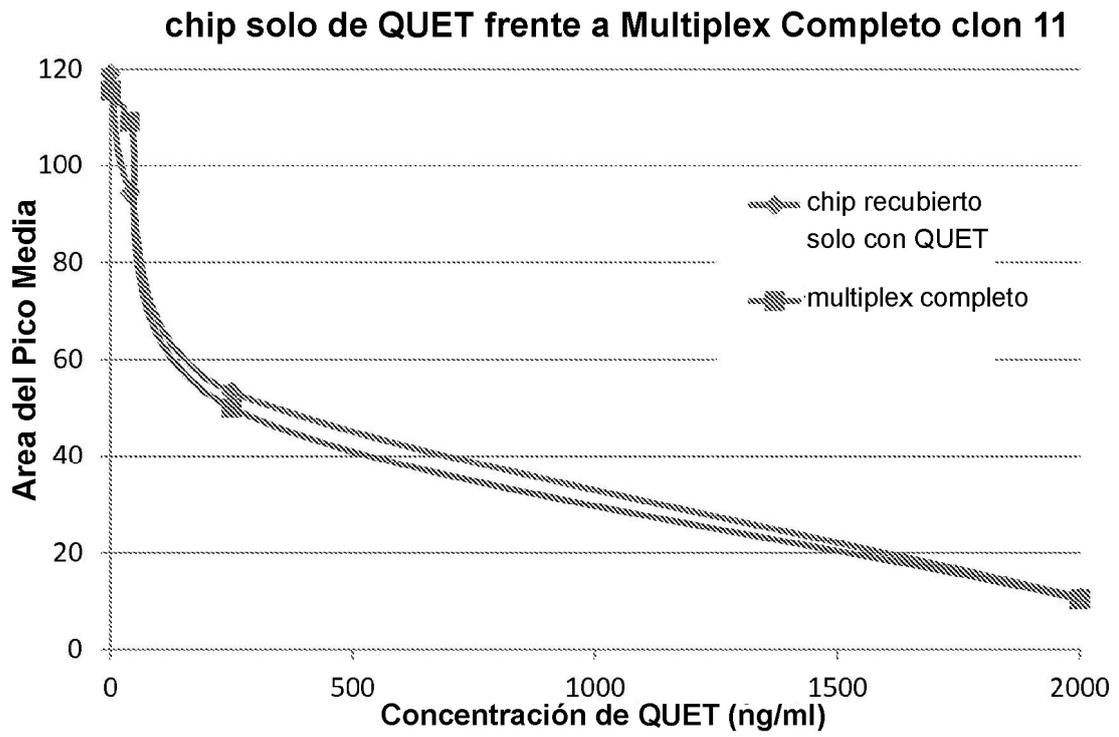


Fig. 24

chip solo de RISP frente a Multiplex Completo Clon 5-9

