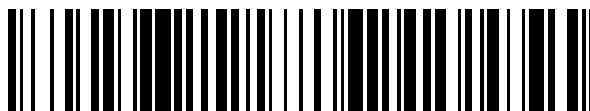


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 383**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013 PCT/US2013/055712**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 13753775 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2888258**

54 Título: **Haptenos de paliperidona**

30 Prioridad:

21.08.2012 US 201261691459 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HASPESLAGH, PIETER RIK;
VLIEGEN, MAARTEN;
HRYHORENKO, ERIC;
DECORY, THOMAS R. y
SANKARAN, BANUMATHI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 739 383 T3

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

DESCRIPCIÓN

Haptenos de paliperidona

5 REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de los beneficios de la presentación de la Solicitud Provisional de EE.UU. N° de Serie 61/691,459, presentada el 21 de agosto de 2012.

10 Campo de la invención

[0002] La invención se refiere al campo de los inmunoensayos para determinar la presencia de la paliperidona en fluidos biológicos humanos.

15 Antecedentes de la invención

[0003] El documento WO 2011/012715 A1 se refiere a hidrogeles insolubles en agua a base de polietilenglicol biodegradables.

20 **[0004]** El documento WO 2011/042450 A1 se refiere a profármacos que comprenden un conjugado portador de paliperidona covalente para uso en el tratamiento.

[0005] El documento EP 2343296 A1 se refiere a un proceso para la purificación de paliperidona.

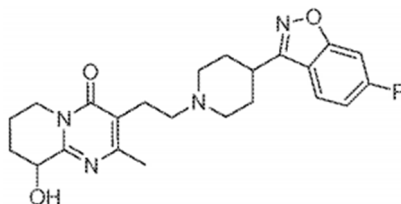
25 **[0006]** La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico crónico y debilitante que afecta aproximadamente al 0,45-1% de las enfermedades de la población del mundo (van Os, J.; Kapur, S. "Schizophrenia" Lancet 2009, 374, 635-645). Los principales objetivos del tratamiento consisten en lograr una remisión sostenida de los síntomas psicóticos, reducir el riesgo y las consecuencias de la recaída y mejorar el funcionamiento del paciente y calidad de vida en general. Si bien muchos pacientes con esquizofrenia logran la estabilidad de los síntomas con los medicamentos antipsicóticos disponibles, la falta de adherencia a la medicación es un motivo común de recaída con 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) investigando 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 mayor mortalidad. Se estima que del 40 al 75% de los pacientes con esquizofrenia tienen dificultades para adherirse a un régimen de tratamiento oral diario (Lieberman, JA; Stroup, TS; McEvoy, JP; Swartz, MS; Rosenheck, RA; Perkins, DO; Keefe, RSE; Davis, S.M.; Davis, CE; Lebowitz, BD; Severo, J.; Hsiao, JK "Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia" New England Journal of Medicine 2005, 353 (12), 1209-1223). El monitoreo terapéutico de medicamentos (TDM) es la cuantificación de las concentraciones séricas o plasmáticas de medicamentos, incluidos los medicamentos antipsicóticos, para el seguimiento del tratamiento y la optimización. Dicha monitorización permite, por ejemplo, la identificación de pacientes que no se adhieren a su régimen de medicación, que no están logrando dosis terapéuticas, que no responden a las dosis terapéuticas, que tienen tolerancia subóptima, que tengan interacciones farmacocinéticas farmacológicas o que tengan un metabolismo anormal que resulte en concentraciones plasmáticas inadecuadas. Existe una considerable variabilidad individual en la capacidad del paciente para absorber, distribuir, metabolizar, y excretar antipsicóticos. Tales diferencias pueden ser causadas por enfermedad concurrente, edad, medicación concomitante o peculiaridades genéticas. Diferentes formulaciones de fármacos también pueden influir en el metabolismo de los fármacos antipsicóticos. TDM permite la optimización de la dosis para pacientes individuales, mejorando los resultados terapéuticos y funcionales. TDM además permite un médico prescriptor para garantizar el cumplimiento de las dosis prescritas y el logro de concentraciones séricas efectivas.

50 **[0007]** 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 UV o detección de espectrometría de masas y radioinmunoensayos (ver, para ejemplo, Woestenborghs et al., 1990 "On the selectivity of some recently developed RIA's" in 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 EE.UU. n° 8,088,594 (y el documento WO 2011/115733 A1) describen un inmunoensayo competitivo para la risperidona utilizando anticuerpos que detectan tanto risperidona como paliperidona pero no metabolitos farmacológicamente inactivos. Los anticuerpos utilizados en el inmunoensayo competitivo se desarrollan contra un inmunógeno particular. ID Labs Inc. (Londres, Ontario, Canadá) comercializa un ELISA para la olanzapina, otra droga antipsicótica, que también utiliza un formato competitivo. Las instrucciones de uso indican que el ensayo está diseñado para fines de detección y destinado a investigación forense o uso, y no está destinado específicamente para uso terapéutico. Las instrucciones recomiendan que todas las muestras positivas deben confirmarse con cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) e indicar que el anticuerpo utilizado detecta olanzapina y clozapina (consulte ID Labs Inc., "Instructions For Use Data Sheet IDEL-

F083", fecha de revisión, 8 de agosto de 2011). Algunos de estos métodos, a saber, HPLC y GC/MS, pueden ser costosos y requieren mucha mano de obra, y generalmente solo se realizan en laboratorios grandes o especializados que cuenten con el equipo adecuado.

5 **[0008]** Existe la necesidad de otros métodos para determinar los niveles de fármacos anti-psicóticos, en particular métodos que se pueden realizar en el consultorio de un médico prescriptor (donde el tratamiento para un paciente individual se puede ajustar en consecuencia) de una manera mucho más oportuna) y en otros entornos médicos que carecen de equipos LC o GC/MS o que requieren resultados del ensayo rápidos.

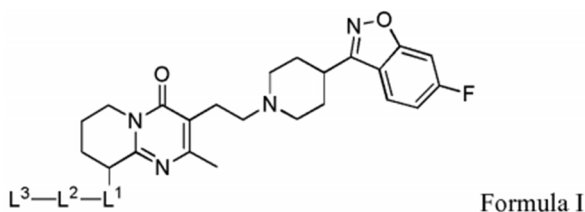
10 **[0009]** La paliperidona es:



20 RESUMEN DE LA INVENCION

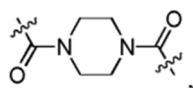
[0010] La presente invención proporciona compuestos y conjugados que permiten un método mejorado de este tipo para la determinación de los niveles de la droga antipsicótica paliperidona.

25 **[0011]** La invención comprende compuestos de Fórmula I

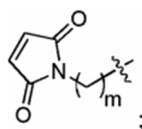


en donde

L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, o $O(CH_2)_n$;
en donde n es 1, 2 o 3;
 L^2 es NHC (O),

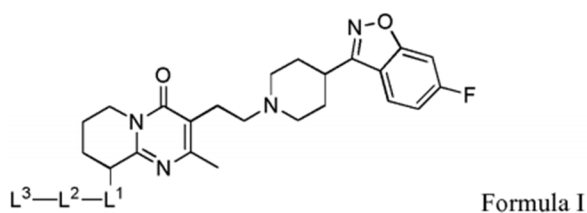


o ausente;
 L^3 es



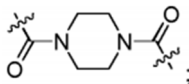
en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L^2 está ausente.

[0012] La invención comprende además compuestos de Fórmula I

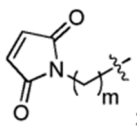


en donde

L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, o $O(CH_2)_n$;
en donde n es 1, 2 o 3;
 L^2 es NHC (O), o



L^3 es $(CH_2)_mCO_2H$, o



en donde m es 1, 2 o 3,

[0013] La invención comprende conjugados de compuestos de la invención con vehículos inmunogénicos, tales como proteínas, y productos producidos por el proceso de poner en contacto los compuestos de la invención con portadores inmunogénicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014]

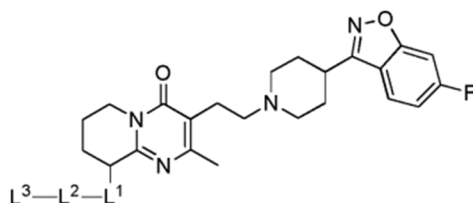
Las FIGS. 1 y 2 muestran resultados competitivos de ELISA generados con hibridoma 5-9;
La FIG. 3 muestra los resultados competitivos de ELISA generados con el clon 2A5 de risperidona/paliperidona;
La FIG. 4 muestra el formato de inmunoensayo competitivo usado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral;
y
La FIG. 5 muestra una curva de respuesta a la dosis típica generada con el clon de risperidona/paliperidona 5-9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0015] La presente invención proporciona compuestos y conjugados que permiten la determinación de los niveles de drogas antipsicóticas. Dichos métodos permitirán a los médicos evaluar objetivamente en una cita lo probable que sea el empeoramiento de los síntomas de un paciente debido a la falta de adherencia. Alternativamente, si cumple, un médico puede considerar una opción de tratamiento diferente. El monitoreo terapéutico de medicamentos, que es habilitado por tales métodos, es clave en la identificación de opciones de tratamiento más efectivas. Además, los clínicos creen que este tipo de TDM les ayudará a moverse hacia una muy diferente relación con sus pacientes, es decir, pasar de una discusión hipotética sobre el incumplimiento del tratamiento a un enfoque más colaborativo al involucrar a los pacientes para que se responsabilicen activamente de optimizar su régimen de tratamiento.

[0016] El desarrollo del método requiere en primer lugar la síntesis de varios inmunógenos, que comprende un hapteno sintético vinculado a una proteína. Un hapteno es una molécula pequeña que puede provocar una respuesta inmune cuando se une a una gran portador tal como una proteína. Son sustancias libres de proteínas, en su mayoría de bajo peso molecular, que no son capaces de estimular la formación de anticuerpos solo, pero que reaccionan con los anticuerpos. Un conjugado hapteno-proteína es capaz de estimular la producción de anticuerpos. La generación específica de anticuerpos contra moléculas pequeñas es útil para el desarrollo de inmunoensayos. (Pharm Res. 1992, 9 (11): 1375-9, Annali Dell'Istituto Superiore di Sanita. 1991, 27 (1): 167-74, Annali Dell'Istituto Superiore di Sanita. 1991, 27 (1): 149-54, Immunology Letters, 1991, 28 (1): 79-83).

[0017] La invención comprende compuestos de Fórmula I



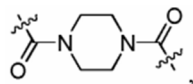
Fórmula I

en donde

L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, o $O(CH_2)_n$;

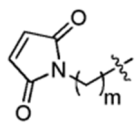
en donde n es 1, 2 o 3;

L^2 es NHC (O),



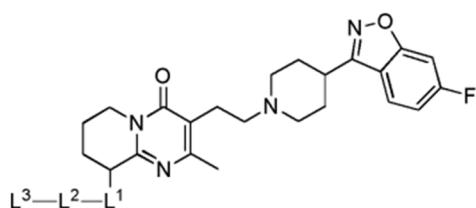
o ausente;

L^3 es



en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L^2 está ausente.

[0018] La invención comprende además compuestos de Fórmula I



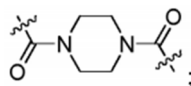
Formula I

en donde

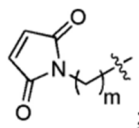
L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, o $O(CH_2)_n$;

en donde n es 1, 2 o 3;

L^2 es NHC (O), o



L^3 es $(CH_2)_mCO_2H$, o



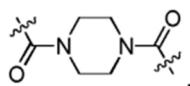
en donde m es 1, 2 o 3.

[0019] En otra realización de la invención:

L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, o $O(CH_2)_n$;

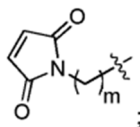
en donde n es 2, o 3;

L^2 es NHC (O),



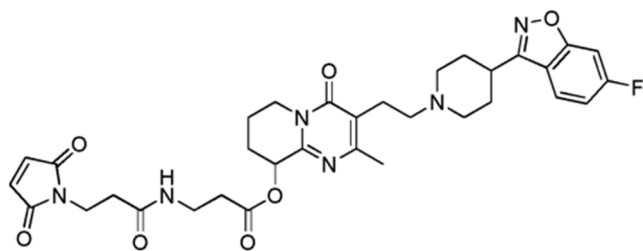
o ausente;

L^3 es

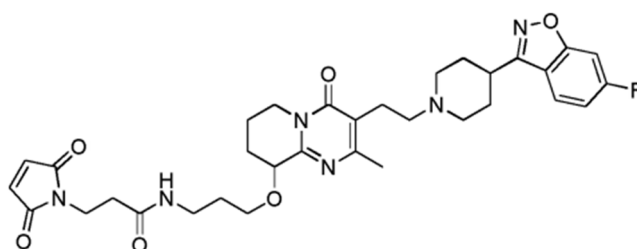


en donde m es 0, 1 o 2; siempre que m solo pueda ser 0 si L² está ausente.

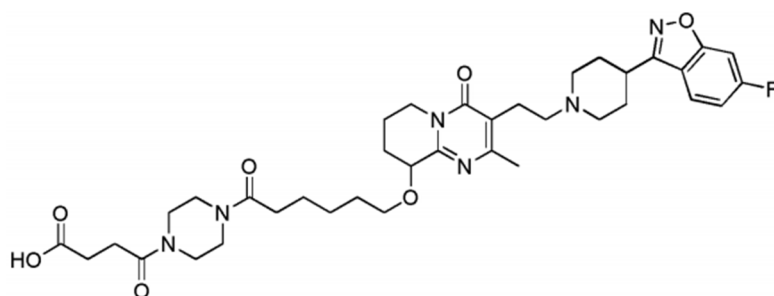
[0020] Otra realización de la invención es un compuesto de Fórmula I que es:



o



[0021] Otra realización de la invención es un compuesto de Fórmula I que es:

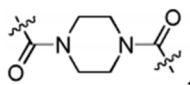


[0022] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en la que

L¹ es OC(O)(CH₂)_n, o O(CH₂)_n;

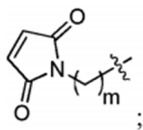
en donde n es 1, 2 o 3;

L² es NHC (O),



o ausente;

L³ es



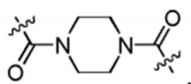
en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L² está ausente; y un portador inmunogénico o una proteína.

[0023] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en la que

L¹ es OC(O)(CH₂)_n, o O(CH₂)_n;

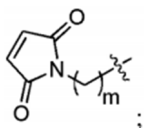
en donde n es 2, o 3;

L² es NHC(O),



o ausente;

L³ es



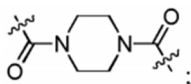
en donde m es 0, 1 o 2; siempre que m solo pueda ser 0 si L² está ausente; y un portador inmunogénico.

[0024] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en la que

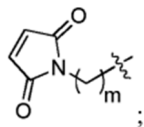
L¹ es OC(O)(CH₂)_n, o O(CH₂)_n;

en donde n es 1, 2 o 3;

L² es NHC(O),



L³ es (CH₂)_mCO₂H, o



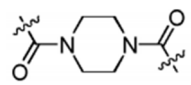
en donde m es 0, 1, 2 o 3; y un portador inmunogénico o una proteína.

[0025] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en la que

L¹ es OC(O)(CH₂)_n, o O(CH₂)_n;

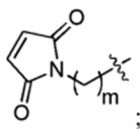
en donde n es 2, o 3;

L² es NHC(O),



o ausente;

L³ es



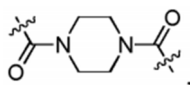
en donde m es 0, 1 o 2; siempre que m solo pueda ser 0 si L² está ausente; y una proteína.

[0026] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en la que

L¹ es OC(O)(CH₂)_n, o O(CH₂)_n;

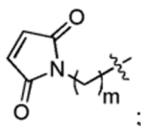
en donde n es 1, 2 o 3;

L² es NHC(O),



G
o ausente;

L³ es



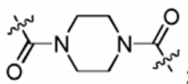
en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L² está ausente; y una proteína en la que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovalbúmina.

[0027] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en la que

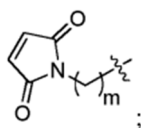
L¹ es OC(O)(CH₂)_n, o O(CH₂)_n;

en donde n es 1, 2 o 3;

L² es NHC(O),

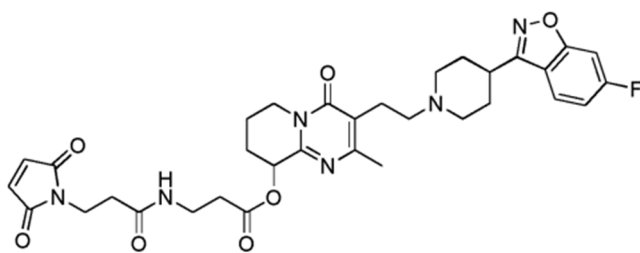


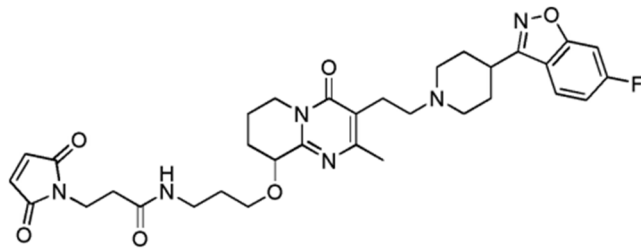
L³ es (CH₂)_mCO₂H, o



en donde m es 0, 1, 2 o 3; y una proteína en la que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina o ovalbúmina.

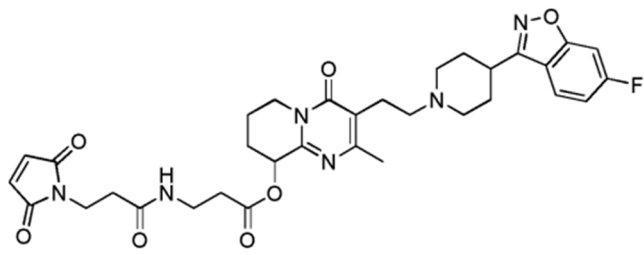
[0028] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



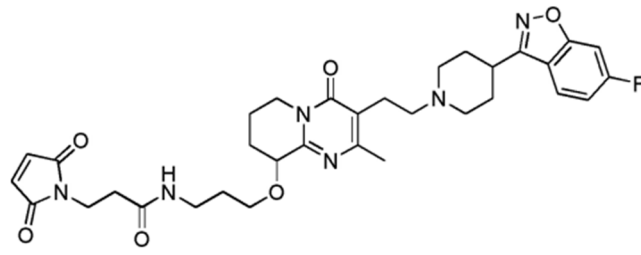


y un portador inmunogénico.

[0029] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

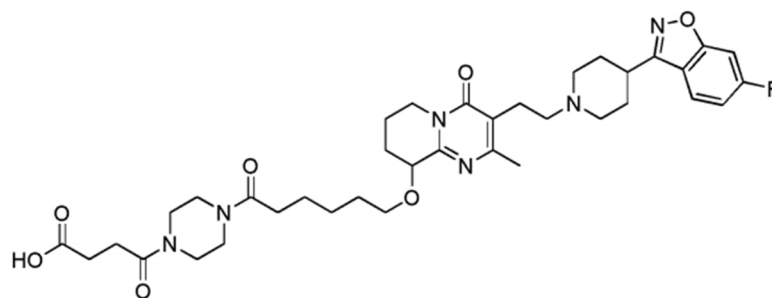


y



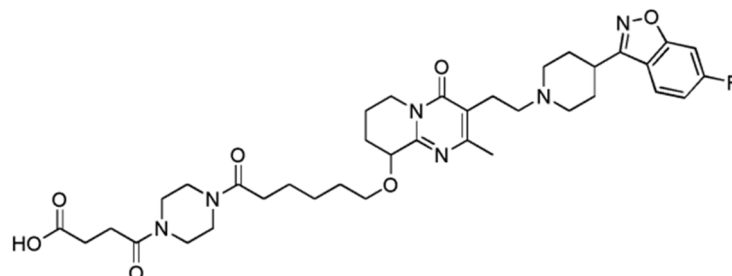
y una proteína.

[0030] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



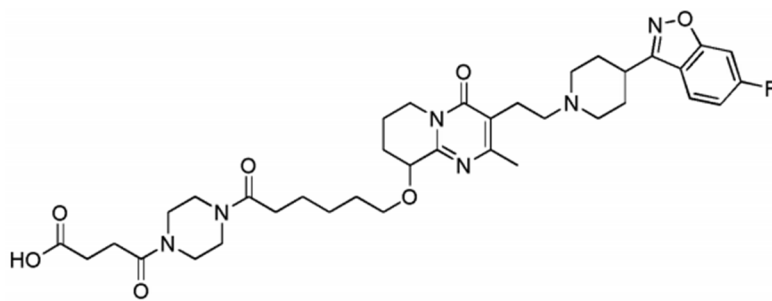
y un portador inmunogénico.

[0031] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



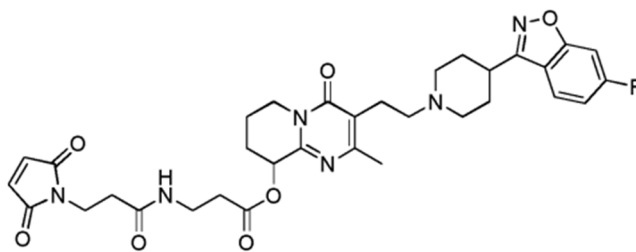
y una proteína.

[0032] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

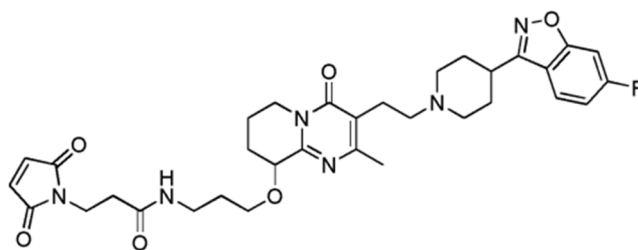


y una proteína, en donde dicha proteína es la hemocianina de lapa californiana, la tiroglobulina bovina, o la ovoalbúmina.

[0033] Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



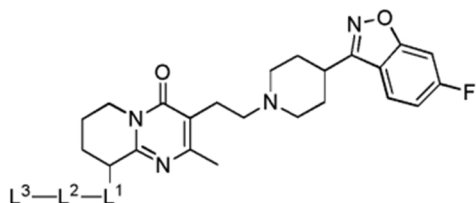
y



y una proteína, en donde dicha proteína es la hemocianina de lapa californiana, la tiroglobulina bovina, o la ovoalbúmina.

[0034] La invención también proporciona productos formados a partir del proceso de poner en contacto los compuestos anteriores con una portador inmunogénico.

[0035] Otra realización de la invención es así un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un compuesto de fórmula I



Formula I

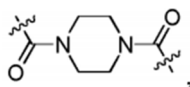
en donde:

L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, o $O(CH_2)_n$;

en donde n es 1, 2 o 3;

L^2 es NHC(O) ,

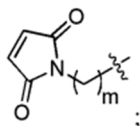
5



o ausente;

10

L^3 es



15

en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L^2 está ausente; con un portador inmunogénico o una proteína.

20

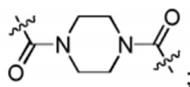
[0036] Otra realización de la invención es un producto hecho por el procedimiento anterior de poner en contacto un compuesto de fórmula I

en donde:

25

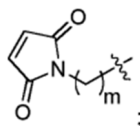
L^1 es $\text{OC(O)}(\text{CH}_2)_n$, o $\text{O}(\text{CH}_2)_n$;
en donde n es 1, 2 o 3;
 L^2 es NHC(O) ,

30



35

L^3 es $(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, o



40

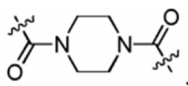
en donde m es 0, 1 o 2; con un portador inmunogénico o una proteína.

[0037] Otra realización de la invención es un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un compuesto de fórmula I en donde:

45

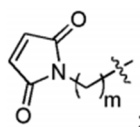
L^1 es $\text{OC(O)}(\text{CH}_2)_n$, o $\text{O}(\text{CH}_2)_n$;
en donde n es 2, o 3;
 L^2 es NHC(O) ,

50



55

o ausente;
 L^3 es

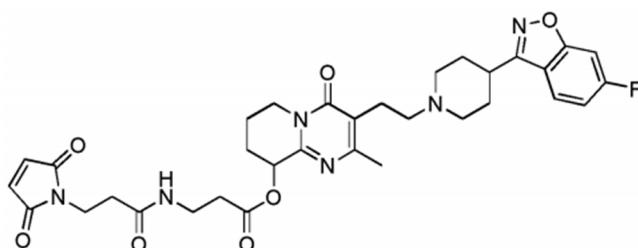


60

en donde m es 0, 1 o 2; siempre que m solo pueda ser 0 si L^2 está ausente; con una proteína en donde la proteína es la hemocianina de lapa californiana, la tiroglobulina bovina, o la ovoalbúmina.

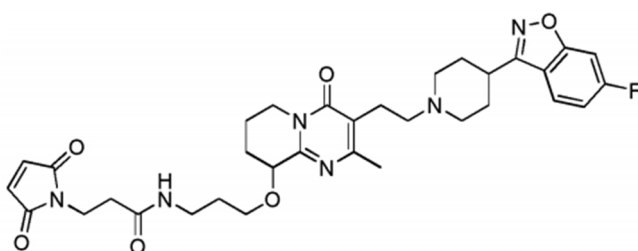
[0038] Otra realización de la invención es un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un compuesto que es

65



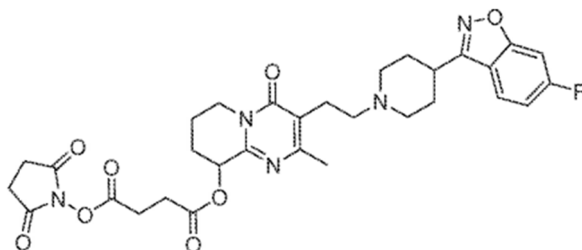
con una proteína, en donde dicha proteína es la hemocianina de lapa californiana, la tiroglobulina bovina o la ovoalbúmina.

[0039] Otra realización de la invención es un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un compuesto que es



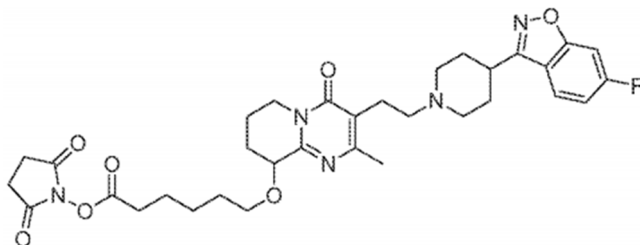
con una proteína, en donde dicha proteína es la hemocianina de lapa californiana, la tiroglobulina bovina o la ovoalbúmina.

[0040] Otra realización de la invención es un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un compuesto que es



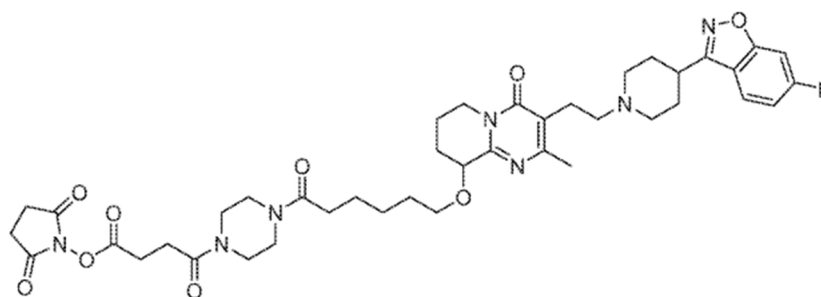
con una proteína, en donde dicha proteína es la hemocianina de lapa californiana, la tiroglobulina bovina o la ovoalbúmina.

[0041] Otra realización de la invención es un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un compuesto que es



con una proteína, en donde dicha proteína es la hemocianina de lapa californiana, la tiroglobulina bovina o la ovoalbúmina.

[0042] Otra realización de la invención es un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un compuesto que es



con una proteína, en donde dicha proteína es la hemocianina de lapa californiana, la tiroglobulina bovina o la ovoalbúmina.

ABREVIATURAS

[0043] En la presente memoria y en toda la aplicación, se pueden usar las siguientes abreviaturas.

20	AMAS	N-(α -maleimidoacetoxi) succinimida éster
	Boc o BOC	terc-butoxicarbonil
	BTG	tiroglobulina bovina
	Bu ₃ N	tributilamina
	DIEA	diisopropiletilamina
25	DCC	diciclohexilcarbodiimida
	DMF	N,N-dimetilformamida
	KLH	Hemocianina de lapa californiana
	SATA	N-succinimidil S-acetiltioacetato
	THF	tetrahidrofurano
30	TFA	ácido trifluoroacético
	18-Cr-6	18-Corona-6
	Et ₃ N	triethylamina
	TBDMS	t-butildimetilsililo
	DIC	diisopropilcarbodiimida
35	DMAP	N,N-dimetil-4-aminopiridina
	EDC	1-etilo-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidahidrocloruro
	NHS	N-hidroxisuccinimida
	TFP	Tetrafluorofenilo
	PNP	p-nitrofenilo
40	TBTU	O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato
	HOBT	N-hidroxibenzotriazol
	DEPBT	3-(dietoxifosforilo)-1,2,3-benzotrazi-4 (3H)-ona
	BOP-Cl	Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)cloruro fosfónico
	DTT	Ditioeritrol

DEFINICIONES

[0044] El término "conjugado" se refiere a cualquier sustancia formada a partir de la unión de piezas separadas. Conjugados representativos de acuerdo con la presente invención incluyen aquellos formados por la unión de una molécula pequeña, tales como los compuestos de Fórmula I, y una molécula grande, como un portador o un polímero de poliamina, particularmente un proteína. En el conjugado, la molécula pequeña puede unirse en uno o más sitios activos en la molécula grande.

[0045] 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 por acoplamiento. un hapteno a un portador inmunogénico de alto peso molecular, y luego inyectar este producto acoplado, es decir, un inmunógeno, en un sujeto humano o animal.

[0046] El término "inmunógeno" se refiere a una sustancia capaz de provocar, producir o generar una respuesta inmune en un organismo.

[0047] Un "portador inmunogénico", como se usa en el presente documento, es una sustancia inmunogénica, comúnmente una proteína, que puede unirse a una o más posiciones con haptenos, lo que permite la producción de anticuerpos que pueden unirse específicamente con estos haptenos. Los ejemplos de sustancias portadoras inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, proteínas, glicoproteínas, complejos poliamino-polisacáridos, partículas y ácidos nucleicos que son reconocidos como extraños y, por lo tanto, producen una respuesta inmunológica del

anfitrión. Los poliamino-polisacáridos se pueden preparar a partir de polisacáridos utilizando cualquiera de los medios conocidos para esta preparación.

[0048] Varios tipos de proteínas se pueden emplear como portadores inmunogénicos, incluyendo sin limitación, albúminas, proteínas de suero, lipoproteínas, etc. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina de suero bovino, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina de huevo, tiroglobulina bovina, albúmina sérica humana de fracción V, albúmina de conejo, globulina de semilla de calabaza, toxoide diftérico, tétanos toxoide, toxina botulinus, proteínas succiniladas y poli(aminoácidos) sintéticos, como la polilisina.

[0049] Portadores inmunogénicos también pueden incluir poli amino-polisacáridos, que son un polímero de alto peso molecular construido por condensaciones repetidas de monosacáridos. Ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa, gomas de carbohidratos como la goma arábiga, el agar, etc. El polisacárido también contiene residuos de poli(aminoácidos) y/o residuos lipídicos.

[0050] El vehículo inmunogénico también puede ser un ácido poli nucleico solo o conjugado a uno de los poli(aminoácidos) o polisacáridos mencionados anteriormente.

[0051] El vehículo inmunogénico también puede incluir partículas sólidas. Las partículas son generalmente de al menos aproximadamente 0,02 micras. (μm) y 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 de agua aproximada, generalmente de aproximadamente 0,7 a 1,5 g/ml, y compuesto de material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos, como células y microorganismos, incluidos ejemplos no limitativos, como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, estafilococos aureus, E. coli y virus.

[0052] Las partículas también pueden estar compuestas de polímeros, liposomas, látex, vesículas de fosfolípidos orgánicos e inorgánicos, o lipoproteínas.

[0053] El término "derivado" se refiere a un compuesto químico o molécula hecha de un compuesto de origen por una o más reacciones químicas.

[0054] 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 como un compuesto de referencia, pero la cadena de carbono del análogo es más larga o más corta que la del compuesto de referencia.

[0055] Un "marcador", "molécula detectora," o "reportero" es cualquier molécula que produce o puede ser inducida a producir una señal detectable. La etiqueta 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. Ejemplos no limitantes de etiquetas incluyen isótopos radiactivos (p.ej., 125I), enzimas (p.ej., β -galactosidasa, peroxidasa), fragmentos de enzima, sustratos de enzimas, inhibidores de enzimas, coenzimas, catalizadores, fluoróforos (p.ej., rodamina, isotiocianato de fluoresceína o FITC, o Dylight 649), colorantes, quimioluminiscentes y luminiscentes (p.ej., dioxetanos, luciferina) o sensibilizadores.

[0056] Como se usa en este documento, un "espaciador" se refiere a una porción de una estructura química que conecta dos o más subestructuras como haptenos, portadores, inmunógenos, etiquetas o parejas de unión a través de un grupo de enlace funcional. Estos grupos espaciadores se componen de los átomos que suelen estar presentes y se ensamblan de manera que se encuentran típicamente en compuestos orgánicos y pueden denominarse "grupos de espaciado orgánico". Los bloques de construcción químicos utilizados para ensamblar los espaciadores serán descritos más adelante 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 reemplazando uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o en el extremo de las cadenas. Por "heteroátomos" se quiere decir átomos distintos al carbono que se eligen del grupo que consiste en 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 sustitución en uno de los átomos de la cadena.

[0057] 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 que no sean hidrógeno a lo largo de la ruta más corta entre las subestructuras conectadas. Las longitudes de cadena preferidas son entre 1 y 20 átomos.

[0058] Un "grupo de unión funcional" se refiere a un grupo reactivo que está presente en un hapteno y puede ser utilizado para proporcionar un sitio reactivo disponible a través del cual la porción de hapteno puede acoplarse a otro resto a través de la formación de un enlace químico covalente para producir un conjugado de un hapteno con otro resto (como una etiqueta o un portador). El hapteno se puede vincular de esta manera a un resto como la biotina para

formar un compañero de unión competitivo para el hapteno.

[0059] Los grupos espaciadores se pueden usar para unir el hapteno al soporte. Los espaciadores de diferentes longitudes permiten unir el hapteno con diferentes distancias desde el portador para su presentación al sistema inmunológico del animal o ser humano inmunizado para la optimización del proceso de formación de anticuerpos. La fijación a diferentes posiciones en la molécula de hapteno permite la oportunidad de presentar sitios específicos en el hapteno al sistema inmunológico para influir en el reconocimiento de anticuerpos. El espaciador puede contener grupos solubilizantes hidrófilos para hacer que el derivado de hapteno sea más soluble en medios acuosos. Los ejemplos de grupos solubilizantes hidrófilos incluyen, pero no se limitan a grupos polioxialquiloxi, por ejemplo, cadenas de glicol de polietileno; grupos de hidroxilo, carboxilato y sulfonato.

[0060] 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 electrónico de un nucleófilo para formar un enlace químico en una reacción.

[0061] 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 sobre la molécula parental. Ejemplos no limitantes de sustituyentes incluyen átomos de halógeno, amino, grupos hidroxilo, carboxi, alquilo, arilo, heteroalquilo, heteroarilo, ciano, alcoxi, nitro, aldehído y cetona.

[0062] El término "alquilo" se refiere a radicales de cadena tanto lineales como ramificados de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique de otro modo, y se destina específicamente a incluir radicales que tengan cualquier grado o nivel de saturación. El alquilo incluye, pero es no limitado a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butil, isobutilo, sec-butil, *terc*-butil, pentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo y dodecilo.

[0063] El término "alqueno" se refiere a un grupo alquilo de hasta 12 átomos de carbono que contiene al menos una insaturación; los ejemplos incluyen, pero no se limitan a vinilo y alilo.

[0064] El término "cicloalquilo" se refiere a un radical de anillo de hidrocarburo monocíclico o bicíclico saturado o parcialmente insaturado compuesto de 3 a 10 átomos de carbono. Los sustituyentes alquilo pueden estar presentes opcionalmente en el anillo. Ejemplos incluyen ciclopropilo, 1,1-dimetil ciclobutilo, 1,2,3-trimetilciclopentilo, ciclohexilo y ciclohexenilo.

[0065] El término "heteroátomo" se refiere a un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo de fósforo o un átomo de azufre en donde los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación permitido.

[0066] 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 de las cadenas.

[0067] El término "heterociclilo" se refiere a un anillo no aromático (*p.ej.*, saturado o parcialmente insaturado) compuesto de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado de N, O o S. Los sustituyentes de alquilo pueden estar presentes opcionalmente en el anillo. Los ejemplos incluyen tetrahidrofurilo, dihidropiranilo, piperidilo, 2,5-dimetilpiperidilo, morfolinilo, piperazinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, imidazolidinilo e imidazolinilo.

[0068] El término "hidroxialquilo" se refiere a al menos un grupo hidroxilo unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

[0069] El término "aminoalquilo" se refiere a al menos un grupo amino primario o secundario unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

[0070] El término "alcoxialquilo" se refiere a al menos un grupo alcoxi unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

[0071] El término "polialcoxialquilo" se refiere a compuestos alcoxi de cadena larga e incluye polietilenglicoles de tamaños discretos o monodispersos.

[0072] El término "tioalquilo" se refiere a al menos un grupo de azufre unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo. El grupo de azufre puede estar en cualquier estado de oxidación e incluye sulfóxidos, sulfonas y sulfatos.

[0073] El término "carboxialquilo" se refiere a al menos un grupo carboxilato unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo. El término "grupo carboxilato" incluye ácidos carboxílicos y ésteres de carboxilato de

alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo.

[0074] El término "alquilcarbonil" se refiere a un grupo que tiene un grupo carbonil unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo.

[0075] El término "heteroarilo" se refiere a radicales de anillo aromático monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 8 a 10 miembros, pudiendo consistir cualquier anillo de los cuales 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.

[0076] El término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo C₁₋₆ alquilo que tiene un sustituyente heteroarilo. Los ejemplos incluyen furiletilo y 2-quinolinilpropilo.

[0077] El término "alcoxi" se refiere a radicales de cadena lineal o ramificada de hasta 12 átomos de carbono, a menos que se indique de otro modo, unido a un átomo de oxígeno. Los ejemplos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi y butoxi.

[0078] El término "arilo" se refiere a sistemas anulares monocíclicos o radicales de anillos aromáticos bicíclicos que contienen de 6 a 12 carbonos en el anillo. Los sustituyentes alquilo pueden estar presentes opcionalmente en el anillo. Los ejemplos incluyen fenilo, bifenilo y naftaleno.

[0079] El término "aralquilo" se refiere a un grupo C₁₋₆ alquilo que contiene un sustituyente arilo. Los ejemplos incluyen bencilo, feniletilo o 2-naftilmetilo.

[0080] El término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo C₁₋₆ alquilo que contiene un sustituyente heteroarilo. Ejemplos incluyen furilmetilo y piridilpropilo.

[0081] El término "ariloxi" se refiere a un átomo de oxígeno unido a un sustituyente arilo. Los ejemplos incluyen fenoxi y benciloxi.

[0082] El término "arilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi unido a un sustituyente arilo. Los ejemplos incluyen fenilmetil éter.

[0083] El término "acilo" se refiere al grupo -C(O)R_a, donde R_a es alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo y heteroaralquilo. Un "agente de acilación" agrega el grupo -C(O)R a a una molécula.

[0084] El término "sulfonilo" se refiere al grupo -S(O)₂R_a, donde R_a es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo y heteroaralquilo. Un "agente de sulfonilación", añade el grupo -S(O)₂R_a a una molécula.

[0085] Los espaciadores que llevan grupos de enlace funcionales reactivos para la unión de haptenos a restos portadores pueden ser preparados por una amplia variedad de métodos. El espaciador puede formarse utilizando una molécula que está funcionalmente diferenciada o activada con grupos en cada extremo para permitir una reacción secuencial selectiva con el hapteno y el portador, pero lo mismo el resto reactivo también se puede utilizar en ambos extremos. Los grupos seleccionados para la reacción con el hapteno y el funcional. El grupo de enlace que se debe vincular al portador está determinado por el tipo de funcionalidad en el hapteno y el portador que el haptense para ser unido con los espaciadores y los métodos de acoplamiento a haptenos y portadores incluyen, entre otros, los descritos por Brinkley, M., A., Bioconjugate Chem. 1992, 3: 2-13, Hermanson, Greg T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Londres, Amsterdam, Burlington, MA, EE.UU., 2008 y *Thermo Scientific Pierce Crosslinking Handbook*, disponible para descarga o solicitud en papel de **Thermo Scientific** 3747 N Meridian Rd, Rockford, IL USA 61101, ph 800-874-3723 o en: <http://www.piercenet.com/> y referencias dentro. Muchas moléculas activadas diferencialmente para la formación de grupos espaciadores están disponibles comercialmente de proveedores, por ejemplo, **Thermo Scientific**.

[0086] Para haptenos que llevan un grupo amino, modos de unión del espaciador al hapteno incluyen la reacción de la amina en el hapteno con un bloque de construcción espaciador que contiene un haluro de acilo o éster activo. Los "ésteres activos" se definen como ésteres que experimentan reacción con un grupo nucleofílico, por ejemplo, un grupo amino, en condiciones suaves para formar un enlace estable. Un enlace estable se define como uno que permanece intacto en condiciones de uso adicional, 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 en Benoiton, NL, en Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry, Thieme Stuttgart, Nueva York, vol. E22, sección 3,2: 443 y Benoiton, NL, Chemistry of Peptide Synthesis, Taylor and Francis, NY, 2006. Los ésteres activos preferidos incluyen el éster p-nitrofenílico (PNP), la N-hidroxisuccinimida éster (NHS) y éster tetrafluorofenílico (TFP). Los haluros de acilo se pueden preparar por muchos métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, reacción del ácido carboxílico con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, ver: Fieser, LF y Fieser, M. Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons, NY, 1967 y referencias dentro. Estos pueden ser convertidos

a otros ésteres activos, como los ésteres de p-nitrofenilo (PNP), que también se pueden usar en espaciadores bi-funcionales activos según lo descrito por Wu et al, Organic Letters, 2004, 6 (24): 4407. Los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) pueden ser preparados por reacción de carbonato de N,N-disuccinimídilo (CAS 74124-79-1) con el ácido carboxílico de un compuesto en la presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiletilamina en un disolvente aprótico en condiciones anhidras como se describe en el ejemplo 35 del documento WO2012012595 o usando N-hidroxisuccinimida y dicitlohexilcarbodiimida (DCC) u otro agente deshidratante, en condiciones anhidras. Los ésteres tetrafluorofenilicos (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 en condiciones anhidras según lo informado por Wilbur, et al., Bioconjugate Chem., 2004,15 (1): 203. Un experto en la materia reconocerá que los espaciadores mostrados en la Tabla 1, entre otros, se puede obtener usando métodos conocidos y se puede unir a haptenos portadores de aminoácidos utilizando la optimización de condiciones de reacción. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un portador.

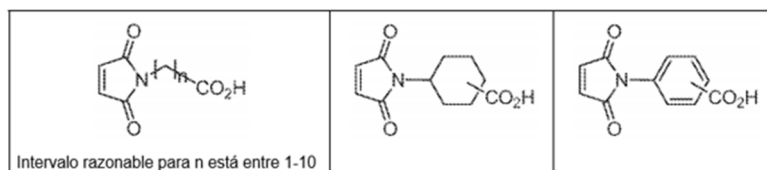
Tabla 1

	Valores razonables para m y n están entre 1 y 10

[0087] El acoplamiento directo de la amina en el hapteno y una funcionalidad de ácido carboxílico en el bloque de construcción espaciador en la presencia de un agente de acoplamiento también se puede utilizar 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, entre otros, tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU, CAS N° 125700-67-6), ver: Pruhs, S., Org. Proceso. Res. Dev. 2006, 10: 441; N-hidroxibenzotriazol (HOBT,

CAS N° 2592-95-2) con un agente deshidratante carbodiimida, por ejemplo, N-N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), o 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidehidrocloruro (EDC), 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 de Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico; (BOP-C1, CAS N° 68641-49-6), ver: Diago-Meseguer, J et.al. Synthesis, 1980, 7: 547-51 y otros descritos en detalle por Benoiton in Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005, Capítulo 2, y el boletín técnico proporcionado por **Tecnologías avanzadas de proteínas peptídicas automatizadas** (aapptec), 6309 Shepardsville Rd., Louisville KY 40228, ph 888 692 9111; www.aapptec.com, y referencias dentro. Estos métodos crean un enlace de amida estable que une el hapteno al espaciador. Se muestran ejemplos de espaciadores que se pueden obtener usando métodos conocidos y se enlazan a haptenos que contienen amino utilizando la optimización de rutina de las condiciones de reacción que emplean los métodos descritos y citados anteriormente, pero no se limitan a los de la Tabla 2. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol sobre un portador.

Tabla 2



[0088] Los espaciadores también pueden construirse de manera gradual por medio de la unión secuencial de grupos químicos apropiados al hapteno que incluyen el paso de formar el grupo de enlace funcional que es capaz de unirse al portador. Ver ejemplos ilustrativos en Esquemas de Reacción Generales.

[0089] Además, cuando el hapteno tiene un grupo nucleófilo, por ejemplo, un grupo tiol, un grupo amino o un grupo hidroxilo del grupo que se convertirá en el punto de unión del separador, el separador también puede ser construido por alquilación del tiol, amina o grupo hidroxilo. Cualquier grupo alquilo que esté apropiadamente sustituido con un resto capaz de sufrir una reacción de sustitución, por ejemplo, un haluro de alquilo o un éster de ácido sulfónico tal como p-toluensulfonato, se puede usar para colocar el espaciador. Un experto en la técnica conoce muchos ejemplos de reacciones de alquilación y pueden encontrarse ejemplos específicos en la literatura química general y optimizados mediante experimentación de rutina. Una discusión de las reacciones de alquilación con muchas referencias se puede encontrar en el Capítulo 10 de March's Advanced Organic Chemistry, Smith, MB, y March, J., John Wiley & sons, Inc. NY, 2001. También se pueden emplear otros enlaces, como la reacción del resto nucleófilo, por ejemplo, una amina, en el hapteno con un isocianato para formar una urea o una reacción con un isotiocianato para formar un enlace de tiourea, ver: Li, Z., et al., Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements, 2003, 173 (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 vehículo, ver: Annunziato, ME, Patel, U.S., Ranade, M. y Palumbo, PS, Bioconjugate Chem., 1993, 4: 212-218.

[0090] Para haptenos que llevan un grupo ácido carboxílico, modos de unión de una porción espaciadora para el hapteno incluyen la activación del grupo de ácido carboxílico como un haluro de acilo o éster activo, ejemplos de los cuales se muestran en la Tabla 3, la preparación de los cuales se describen anteriormente, seguido de la 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 ácido carboxílico con un grupo amino en la porción espaciadora o directamente en el portador con un reactivo de acoplamiento peptídico y/o reactivo deshidratante 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 peptídicos puede emplearse para la unión de haptenos que contienen ácido carboxílico a los bloques de construcción espaciadores y portadores de proteínas con grupos amino disponibles que utilizan la optimización de rutina de las condiciones de reacción.

Tabla 3

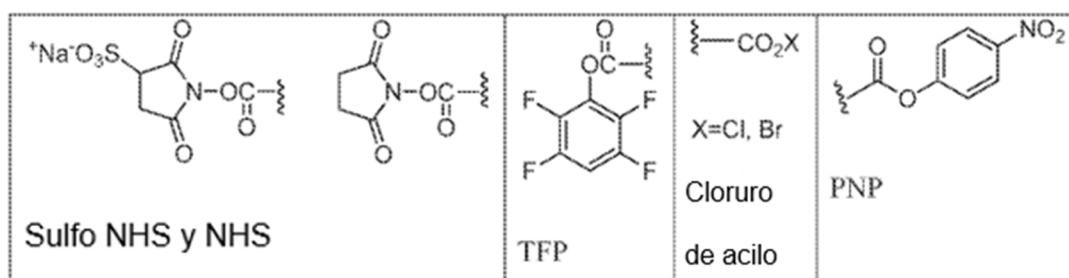


Tabla 4

HOBT	DEPT	BOP-Cl	TBTU
-------------	-------------	---------------	-------------

Tabla 5

 diisopropylcarbodiimida ; (DIC)	 Diciclohexilcarbodiimida (DCC)	 1-etilo- 3(3-dimetilaminopropilo) Carbodiimida.HCl (EDC)
--	---	--

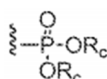
[0091] Otros grupos electrófilos pueden estar presentes en el hapteno para unir el espaciador, por ejemplo, un haluro de sulfonilo



o un grupo de fósforo electrófilo, por ejemplo:



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



[0092] R_c es alquilo, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo.

[0093] Véase: Aliouane, L., et.al, Tetrahedron Letters, 2011, 52 (28): 8681.

[0094] Los haptenos que llevan grupos aldehído o cetona pueden unirse a los espaciadores utilizando métodos que incluyen, entre otros, la reacción con un grupo de hidrazida $\text{H}_2\text{N-NH-C(O)-}$ en el espaciador para formar una acilhidrazona, ver: Chamow, SM, Kogan, TP, Peers, DH, Hastings, RC, Byrn, RA y Askenaszi, A., J. Biol. Chem., 1992, 267 (22): 15916. Los ejemplos de grupos espaciadores de hidrazida bifuncionales que permiten la unión a un grupo tiol en el portador se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6


O=C1C=CC(=O)N1C2=CC=CC=C2CCCC(=O)NNH2


O=C1C=CC(=O)N1CC(=O)NNH2

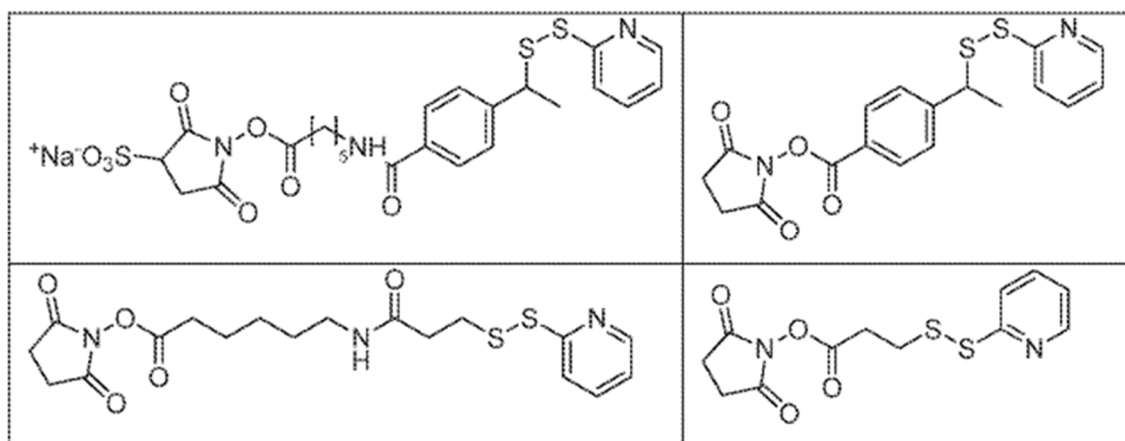
[0095] Los haptenos también pueden contener grupos tiol que pueden reaccionar con el vehículo siempre que el vehículo se haya modificado para proporcionar un grupo que pueda reaccionar con el tiol. Los grupos portadores

pueden modificarse mediante métodos que incluyen, entre otros, la unión de un grupo que contiene un grupo funcional maleimida mediante la reacción de un grupo amino en el vehículo 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 sufrir una reacción que provoque la unión del hapteno al portador.

[0096] El grupo de unión funcional capaz de formar un enlace con el portador puede ser cualquier grupo capaz de formar un enlace estable y puede ser reactivo a varios 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 del mismo. Ejemplos no limitativos del grupo de enlace funcional son un grupo ácido carboxílico, haluro de acilo, éster activo (como se definió anteriormente), isocianato, isotiocianato, haluro de alquilo, grupo amino, grupo tiol, grupo maleimida, grupo acrilato ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHC}(\text{O})-$) o grupo de vinil sulfona $\text{H}_2\text{C}=\text{CH-SO}_2-$ Ver: Park, JW, et.al., Bioconjugate Chem., 2012, 23 (3): 350. el grupo de enlace puede estar presente como parte de un bloque de construcción espaciador activado de forma diferencial que puede hacerse reaccionar gradualmente con el hapteno y el derivado de hapteno resultante puede hacerse reaccionar con el portador. Alternativamente, el hapteno se puede derivar 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 ácido carboxílico, la reacción de acoplamiento con el grupo ácido carboxílico o la amina en el vehículo se puede llevar a cabo directamente mediante el uso de reactivos de acoplamiento peptídicos de acuerdo con los procedimientos en las referencias citadas anteriormente para estos reactivos.

[0097] Se pueden usar grupos disulfuro particulares, por ejemplo, piridildisulfuros, como el grupo de enlace funcional en el espaciador que puede sufrir intercambio con un grupo tiol en el portador desde un enlace de disulfuro mixto, ver: Ghetie, V., et al., Bioconjugate Chem., 1990, 1:24-31. Estos espaciadores se pueden unir por reacción del hapteno que contiene amina con un éster activo que se une a un espaciador que lleva el grupo piridildisulfuro, cuyos ejemplos incluyen pero no se limitan a los que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

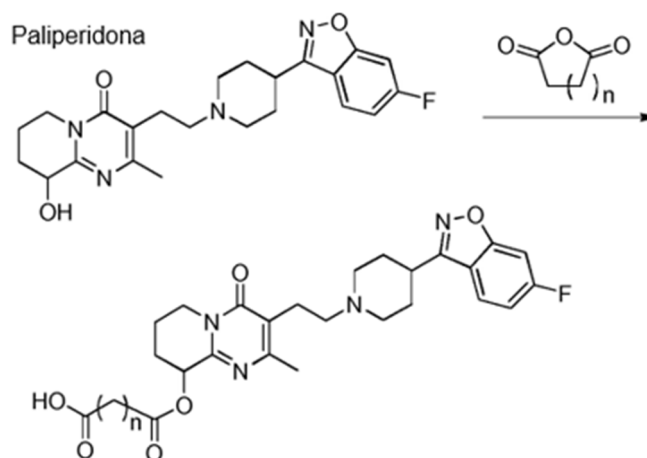


[0098] Más frecuentemente el portador es una proteína y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina pueden ser utilizados para la fijación, ya sea directamente por reacción con un grupo de unión funcional de amina reactiva o después de la derivatización con una que contiene grupo tiol, incluyendo *N*-Succinimidil S-Acetilacetato, (SATA, CAS 76931-93-6), o un análogo del mismo, seguido de escisión del grupo acetato con hidroxilamina para exponer el grupo tiol para la reacción con el grupo de enlace funcional en el hapteno. Los grupos tiol también pueden introducirse en el portador mediante la reducción de enlaces disulfuro dentro de portadores proteicos con reactivos reductores suaves que incluyen, entre otros, 2-mercaptoetilamina, ver: Bilah, M., et al., BioelectroChemistry, 2010, 80 (1): 49, reactivos de fosfina, ver: Kirley, TL, Analytical BioChemistry, 1989, 180 (2): 231 o ditioneritrol (DTT, CAS 3483-12-3) Cleland, W., Bioquímica, 1964, 3: 480-482.

ESQUEMAS GENERALES DE REACCIÓN

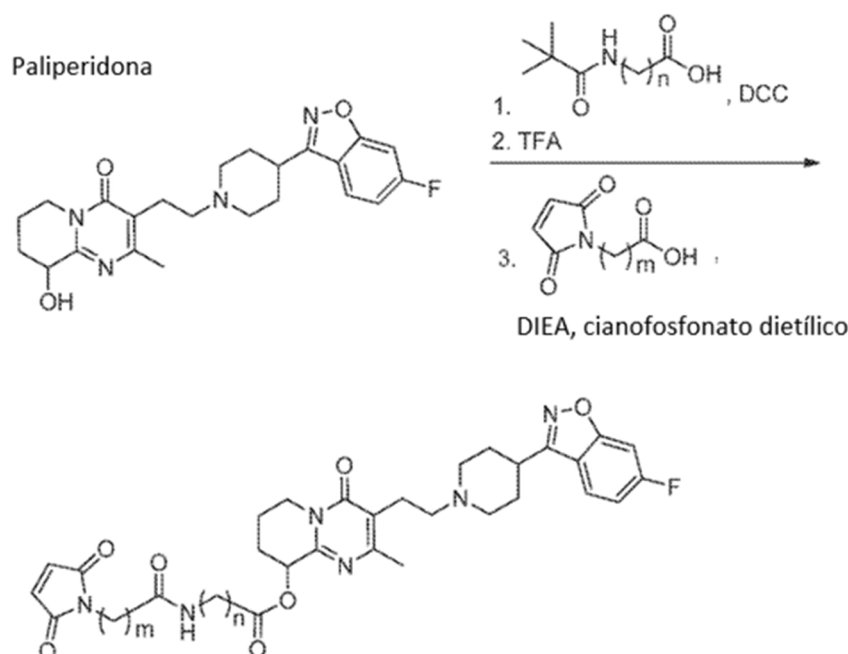
[0099] Los compuestos representativos de la presente invención se pueden sintetizar de acuerdo con los métodos sintéticos generales descritos a continuación. Los compuestos de Fórmula (I) se pueden preparar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los siguientes esquemas de reacción solo pretenden representar ejemplos de la invención y de ninguna manera pretenden ser un límite de la invención.

Esquema 1

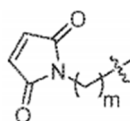


[0100] Los compuestos de Fórmula I como se describe en este documento, donde L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, L^2 está ausente, y L^3 es CO_2H , pueden hacerse de acuerdo con el Esquema 1. La reacción de paliperidona de hapteno procede con un compuesto de anhídrido cíclico, como el anhídrido succínico o el anhídrido glutárico, en un disolvente como la piridina, a temperaturas que oscilan entre la temperatura ambiente y $60^\circ C$, durante aproximadamente 48 horas.

Esquema 2



Los compuestos de Fórmula I donde L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, L^2 es $NHC(O)$, y L^3 es



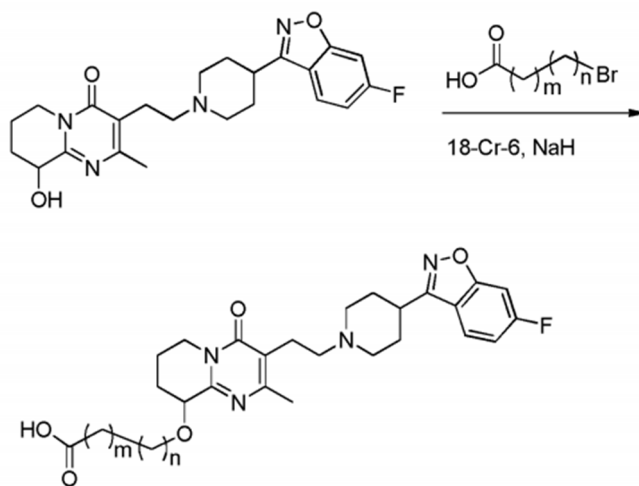
se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 2. La condensación de un aminoácido protegido de boc adecuado, tal como la glicina, con paliperidona, se logra utilizando un agente deshidratante como la dicitohexilcarbodiimida. La reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico, como el diclorometano, a temperatura ambiente, utilizando una base como la *N,N*-dimetil-4-piridinamina. La desprotección del grupo amina procede con ácido trifluoroacético, fluyendo mediante la posterior adición de la funcionalidad de maleimida. La maleimida puede introducirse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la reacción con un aminoácido de alquilo sustituido con *N*-maleoil (como se muestra en el esquema 2) en un disolvente como el diclorometano y reactivos de acoplamiento como la

diisopropiletilamina y el cianofosfonato de dietilo proporciona el enlazador funcionalizado con maleimida en el hapteno. Alternativamente, se pueden usar otros grupos de funcionalización con maleimida, como el 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato, en un solvente como DMF y bases., como la tributilamina.

- 5 **[0101]** Los procedimientos del Esquema 2 también pueden utilizarse para los compuestos de Fórmula I donde L^1 es $O(CH_2)_n$. La paliperidona, en cambio, reacciona con un bromuro de aminoalquilo protegido con boc apropiado (como el bromuro de boc-aminopropilo), 18-Corona-6 e hidruo de sodio, en un disolvente como THF, a aproximadamente la temperatura ambiente, durante aproximadamente 6 horas. La eliminación posterior del grupo protector de boc y la instalación de la funcionalidad de maleimida proceden como se describe en el Esquema 2.

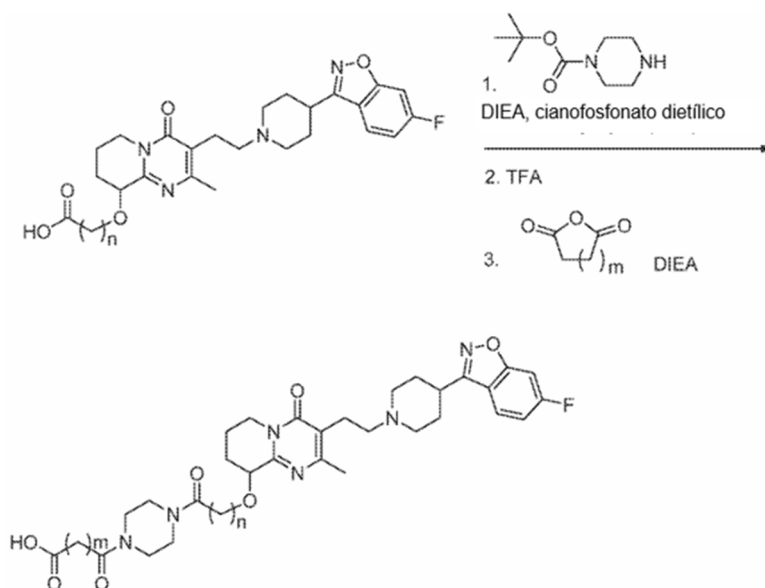
Esquema 3

Paliperidona

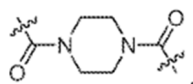


[0102] Los compuestos de Fórmula I como se describe en este documento, donde L^1 es $O(CH_2)_n$, L^2 está ausente, y L^3 es $(CH_2)_mCO_2H$, pueden ser hechos de acuerdo con el Esquema 3. La paliperidona se reacciona con un bromuro de alquilo sustituido con CO_2H en un disolvente, tal como THF, en presencia de 18-Corona-6 e hidruo de sodio, durante aproximadamente 18 h.

Esquema 4

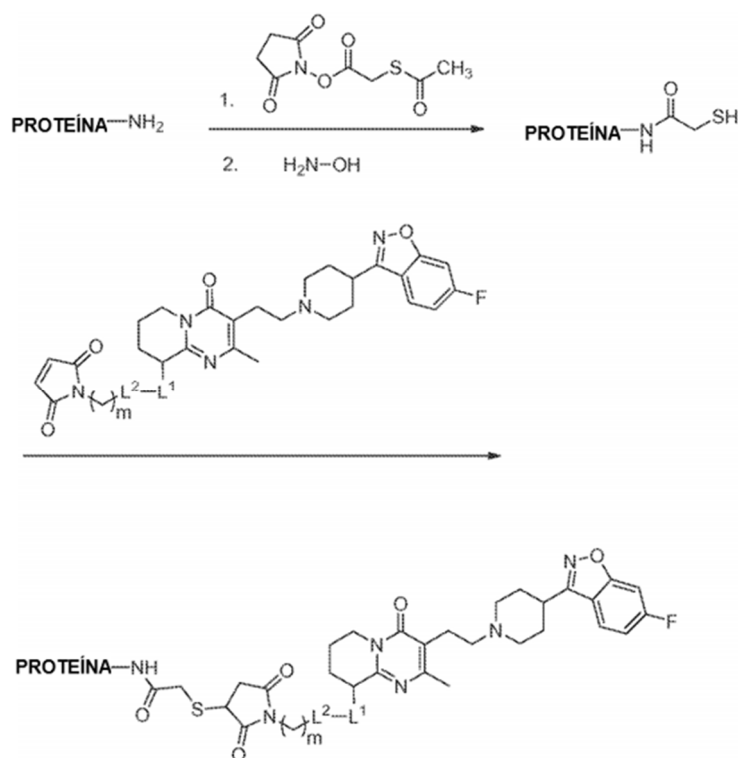


Compuestos de Fórmula I donde L^1 es $O(CH_2)_n$, L^2 es



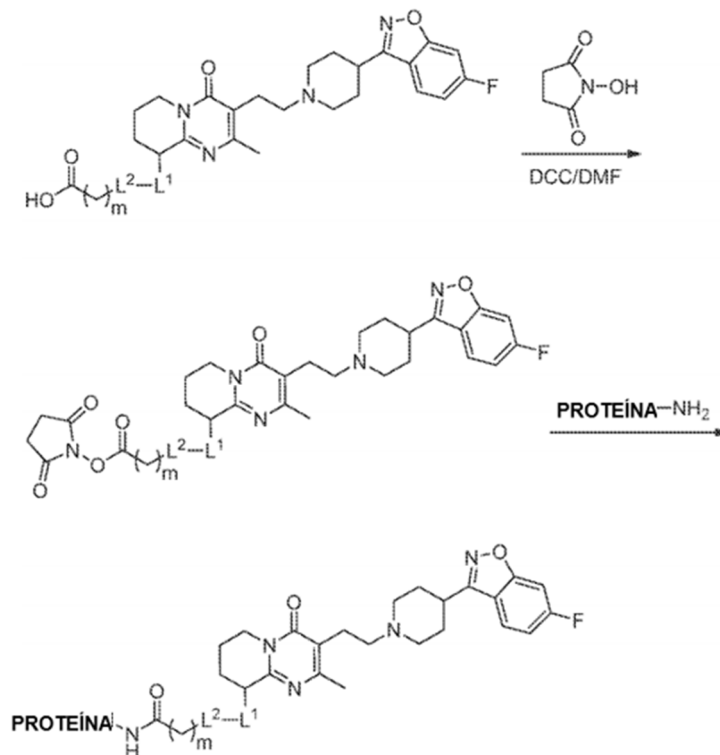
y L^3 es $(CH_2)_mCO_2H$ pueden prepararse de acuerdo con el Esquema 4. La paliperidona funcionalizada con un enlazador y CO_2H , preparados como se describe en el esquema 3, se tratan con *N*-*t*-butoxicarbonilpiperazina, cianofosfonato dietílico y una base, tal como diisopropiletilamina. La reacción se lleva a cabo en 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, tal como anhídrido succínico o anhídrido maleico, en presencia de una base adecuada tal como diisopropiletilamina. Alternativamente, un experto en la técnica reconocerá que el grupo piperazinilo desprotegido puede estar elaborado con una funcionalidad demmaleimida, tal como se describe en el Esquema 2.

Esquema 5



[0103] Los haptenos funcionalizados con maleimida se pueden conjugar con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 5. La activación de los residuos de lisina de proteína por acilación del épsilon-nitrógeno con N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA) seguido de la posterior hidrólisis del grupo S-acetilo con hidroxilamina produce un grupo sulfhidrido nucleófilo. La conjugación de la proteína activada con sulfhidrido con el hapteno derivado de maleimida (preparado como se describe en general Esquema 2) procede a través de 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 ovalbúmina.

Esquema 6:



[0104] Haptenos funcionalizados con ácido carboxílico se pueden conjugar con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 6. La reacción con N-hidroxisuccinimida y un agente de acoplamiento adecuado, tal como diciclohexilcarbodiimida, y una base, tal como tributilamina, en un disolvente tal como DMF, a una temperatura de aproximadamente 20°C, durante aproximadamente 18 horas activa el ácido carboxílico con el grupo saliente. El enlazador activado y el hapteno se pueden conjugar a una proteína en un disolvente, como un tampón de fosfato de pH 7,5, a aproximadamente 20°C, durante aproximadamente 2,5 horas. Las proteínas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

[0105] Los conjugados anteriores son útiles para la producción de anticuerpos que se enlazan al fármaco antipsicótico al que se generaron (paliperidona). Estos anticuerpos pueden usarse en ensayos para detectar la presencia y/o la cantidad del fármaco antipsicótico en muestras de pacientes. Dicha detección permite la monitorización terapéutica del fármaco permitiendo todos sus beneficios. La detección de niveles de fármacos antipsicóticos puede ser útil para muchos propósitos, entre ellos: detección en combinación con la detección de otros fármacos antipsicóticos, incluidos los seleccionados del grupo que consiste en risperidona, paliperidona, quetiapina, olanzapina y sus metabolitos. Dicha detección permite la medición simultánea de estos antipsicóticos; la determinación de la adherencia del paciente o el cumplimiento de la terapia prescrita; la utilización como herramienta de decisión para determinar si un paciente debe convertirse de un régimen oral antipsicótico a un régimen inyectable de acción prolongada antipsicótica; la utilización como una herramienta de decisión para determinar si el nivel de dosis o el intervalo de dosificación de los antipsicóticos orales o inyectables debe aumentarse o disminuirse para garantizar el logro o el mantenimiento de niveles de fármacos eficaces o seguros; la utilización como ayuda en el inicio de la terapia con medicamentos antipsicóticos al proporcionar evidencia del logro de niveles mínimos de pK; la utilización para determinar la bioequivalencia de los fármacos antipsicóticos en formulaciones múltiples o de múltiples fuentes; la utilización para evaluar el impacto de la polifarmacia y las posibles interacciones farmacológicas; y la utilización como una indicación de que un paciente debe ser excluido o incluido en un ensayo clínico y como ayuda en el seguimiento posterior de la adherencia a los requisitos de medicación del ensayo clínico.

[0106] Habiendo proporcionado los conjugados de la presente invención, que comprenden los compuestos de este documento y un vehículo inmunogénico, pueden generarse anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados, que se enlazan al fármaco antipsicótico. Dichos anticuerpos que se contemplan particularmente incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, así como también fragmentos de los mismos, por ejemplo, proteínas recombinantes, que contienen el dominio de unión a antígeno y/o una o más regiones determinantes de la complementariedad de estos anticuerpos. Preferiblemente, el anticuerpo se unirá al fármaco y cualesquiera metabolitos farmacológicamente activos deseados. Al alterar la ubicación de la unión de un portador

inmunogénico en un conjugado de fármaco, la selectividad y la reactividad cruzada con metabolitos y/o fármacos relacionados se pueden diseñar en los anticuerpos. Para paliperidona (9-hidroxisperidona), reactividad cruzada con risperidona u otros metabolitos de risperidona como 7-hidroxisperidona y N-dealquilrisperidona pueden o no ser deseables. Un anticuerpo que reaccione de forma cruzada con risperidona y paliperidona puede ser deseable, que no reaccione con la 7-hidroxisperidona o la N-desalquilrisperidona, detectando así la risperidona y su principal metabolito farmacológicamente activo, la paliperidona. Alternativamente, puede ser deseable detectar los metabolitos farmacológicamente activos, risperidona y paliperidona, por separado, mientras que todavía no se detectan los metabolitos inactivos, 7-hidroxisperidona y N-dealquilrisperidona. Se pueden generar anticuerpos que detectan varios de estos fármacos y/o metabolitos, o se pueden generar 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 de uno o más compuestos es equimolar o sustancialmente equimolar.

[0107] Los procedimientos para producir tales anticuerpos comprenden inocular un huésped con el conjugado (el compuesto y el portador inmunogénico que es un inmunógeno) que incorpora características de la presente invención. Los huéspedes adecuados incluyen, entre otros, ratones, ratas, hámsters, 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 que incluyen "The Immunoassay Handbook", 2ª edición, editado por David Wild (Nature Publishing Group, 2000) y las referencias citadas en el mismo.

[0108] Preferiblemente, un inmunógeno que incorpora características de la presente invención se administra a un sujeto huésped, por ejemplo, un animal o humano, en combinación con un adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, hidróxido de aluminio en polvo (alumbre), hidróxido de aluminio junto con Bordetella pertussis, y dicoronomicolato de trehalosa sintético monofosforil lípido A (MPL-TDM).

[0109] Los anticuerpos policlonales pueden ser criados en un huésped mamífero por una o más inyecciones de un inmunógeno, que opcionalmente pueden administrarse junto con un adyuvante. Típicamente, un inmunógeno o una combinación de un inmunógeno y un adyuvante se inyecta en un huésped mamífero mediante una o múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Preferiblemente, el programa de inmunización se lleva a cabo durante al 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.

[0110] Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos por los métodos de hibridoma bien establecidas de Kohler y Milstein, por ejemplo, Nature 256: 495-497 (1975). Los métodos de hibridoma típicamente involucran la inmunización de un huésped o linfocitos de un huésped, la recolección del anticuerpo monoclonal que secreta o que tiene el potencial de secretar linfocitos, la fusión de los linfocitos a células immortalizadas y la selección de células que secretan el anticuerpo monoclonal deseado.

[0111] Un huésped puede inmunizarse para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos específicos para un inmunógeno. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados in vitro. Si se desean células humanas, se pueden usar linfocitos de sangre periférica, aunque se prefieren células de bazo o linfocitos de otras fuentes de mamíferos.

[0112] Los linfocitos pueden fusionarse con una línea celular immortalizada para formar células de hibridoma, un proceso que puede ser facilitado por el uso de un agente de fusión, por ejemplo, polietilenglicol. A modo de ilustración, se pueden usar células de mieloma de roedor, bovino o humano mutantes immortalizadas por transformación. Se prefieren poblaciones sustancialmente puras de células de hibridoma, en oposición a células immortalizadas no fusionadas. Por lo tanto, después de la fusión, las células pueden crecer en un medio adecuado que inhibe el crecimiento o la supervivencia de células immortalizadas no fusionadas, por ejemplo, mediante el uso de células de mieloma mutantes que carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). En tal caso, se pueden agregar hipoxantina, aminopterina y timidina al medio (medio HAT) para prevenir el crecimiento de células deficientes en HGPRT mientras se permite que crezcan los hibridomas.

[0113] Preferiblemente, las células immortalizadas se fusionan eficientemente, se pueden aislar de poblaciones mixtas por selección en un medio tal como HAT, y apoyar la expresión estable y de alto nivel de anticuerpo después de la fusión. Las líneas celulares immortalizadas preferidas incluyen líneas celulares de mieloma disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

[0114] Debido a que las células de hibridoma típicamente secretan anticuerpos extracelularmente, los medios de cultivo pueden analizarse para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para el fármaco antipsicótico. La inmunoprecipitación de los ensayos de unión in vitro, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoenzimático (ELISA), se puede usar para medir la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales.

[0115] Las células de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales se pueden aislar como clones individuales por procedimientos de dilución limitante y sub-cultivos. Los medios de cultivo adecuados incluyen, pero no están limitados a, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco, RPMI-1640, y medios libres de polipéptidos, reducidos de

polipéptidos o libres de suero, por ejemplo, Ultra DOMA PF o HL-1, disponibles en Biowhittaker, Walkersville, MD. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como ascitis.

[0116] Los anticuerpos monoclonales pueden ser aislados y/o purificados a partir de un medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación convencionales de inmunoglobulina (Ig), incluyendo, pero no limitado a, polipéptido A-SEFAROSA, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía de afinidad.

[0117] Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos recombinantes, como se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4,166,452. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar utilizando procedimientos convencionales, por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que se enlazan específicamente a genes de cadenas de anticuerpos pesados y ligeros murinos, preferiblemente para sondear ADN aislado de líneas de células de hibridoma de anticuerpos monoclonales que secretan anticuerpos específicos para fármacos antipsicóticos.

INMUNOENSAYOS

[0118] Los anticuerpos producidos de este modo pueden ser utilizados en inmunoensayos para reconocer/unir al fármaco anti-psicótico, detectando de este modo la presencia y/o cantidad de la droga 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 lugares, en Hampton et al.

[0119] (Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul, MN 1990) y Maddox et al. (J. Exp. Med. 158: 12111, 1983).

[0120] Puede también estar previsto un kit de reactivos que comprende un anticuerpo como se describe anteriormente. Un kit de reactivo representativo puede comprender un anticuerpo que se une al fármaco antipsicótico, paliperidona, un complejo que comprende un análogo de un fármaco antipsicótico o un derivado del mismo acoplado a un resto de marcaje, y opcionalmente también puede comprender uno o más calibradores que comprenden una cantidad conocida de un medicamento antipsicótico o un estándar relacionado.

[0121] Como se señaló anteriormente, kits de reactivos pueden comprender calibradores y/o materiales de control que comprenden una cantidad conocida del analito a medir. La concentración del analito se puede calcular comparando los resultados obtenidos para una muestra con resultado obtenido para un estándar. Se puede construir y utilizar una curva de calibración para relacionar los conjuntos de resultados y para determinar la concentración de un analito en una muestra.

[0122] 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 tal como un fluido corporal de un huésped, más preferiblemente plasma o suero.

[0123] Solicitudes que se combinan y que se titulan "Haptens of Aripiprazole" (N° de Expediente de Apoderado PRD3265USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Haptens of Olanzapine" (N° de Expediente de Apoderado PRD3266USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Haptens of Paliperidone" (N° de Expediente de Apoderado PRD3267USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Haptens of Quetiapine" (N° de Expediente de Apoderado PRD3268USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Haptens of Risperidone and Paliperidone" (N° de Expediente de Apoderado PRD3269USPSP, primer inventor nombrado: Remmerie), "Antibodies to Aripiprazole Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5128USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Olanzapine Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5132USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Paliperidone Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5126USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Quetiapine Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5134USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Risperidone Haptens and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5130USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Aripiprazole and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5129USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Olanzapine and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5133USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Paliperidone and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5127USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Quetiapine and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5135USPSP, primer inventor nombrado: Hryhorenko), "Antibodies to Risperidone and Use Thereof" (N° de Expediente de Apoderado CDS5131USPSP, primer inventor: Hryhorenko).

EJEMPLOS

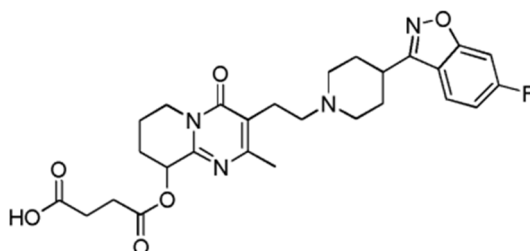
[0124] Los compuestos representativos de la presente invención se pueden sintetizar de acuerdo con los métodos

generales sintéticos descritos a continuación. Los compuestos de Fórmula (I) se pueden preparar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los siguientes ejemplos solo pretenden representar ejemplos de la invención y de ninguna manera pretenden ser un límite de la invención.

5 Ejemplo de referencia 1

4-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)-4-ácido oxobutanoico

10 [0125]



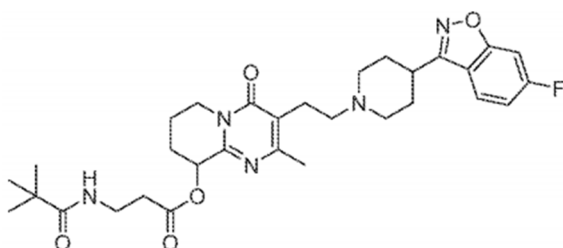
[0126] Se disolvió paliperidona (10 g, 23,45 mmol) en piridina (100 ml) junto con N,N-dimetil-4-piridinamina (0,5 g; 4,09 mmol) y anhídrido succínico (18,3 g; 182,86 mmol). La mezcla se agitó bajo una atmósfera de argón durante 4 horas a 60°C y durante 48 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó y se disolvió en diclorometano/metanol (100 ml/10 ml) y agua (100 ml). La fase acuosa se extrajo cinco veces con diclorometano/metanol (100 ml/10 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente con cloroformo/etanol 80/20 a 70/30). El producto se disolvió en isopropanol (50 ml) y el precipitado resultante se filtró y se lavó con isopropanol (10 ml). El precipitado se secó *al vacío* para dar el compuesto del título en forma de un sólido blanco. ESI-MS (M+1) 528. ¹H RMN: (DMSO-*d*₆, 360 MHz): δ ppm 1,75-2,75 (m, 23H), δ 3,5-4,0 (m, 3H), δ 5,74 (m, 1H), δ 7,28 (td, *J* = 9,15, 2,20 Hz, 1H), δ 7,69 (dd, *J* = 8,96, 2,01 Hz, 1H), δ 8,02 (dd, *J* = 8,78, 5,12 Hz, 1H).

Ejemplo 2

35 Paso A

3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il3-pivalamidopropanoato

40 [0127]

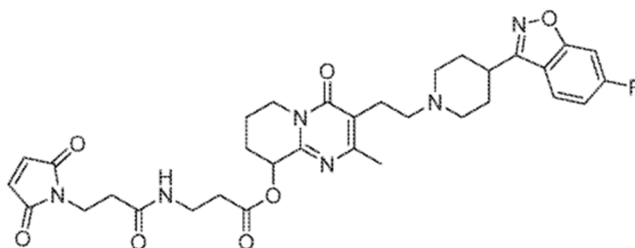


[0128] una solución de paliperidona (1,0 g, 2,34 mmol) en diclorometano (20 ml) se trató con Boc-*b*-Ala-OH (443,65 mg, 2,34 mmoles), diciohexilcarbodiimida (483,79 mg, 2,34 mmoles) y N,N-dimetil-4-piridinamina (14,32 mg, 0,117 mmoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después de 18 h, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (tres veces 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución con diclorometano/metanol (95/5) para obtener el compuesto del título. ESI-MS (M+1) 598.

60 Paso B

3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanoato.

65 [0129]



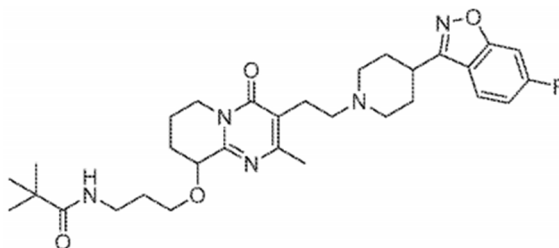
[0130] Una solución de 3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il 3-pivalamidopropanoato, preparado como se describe en el Paso A, (901,5 mg, 1,15 mmol) en diclorometano (20 ml) y ácido trifluoroacético (5,7 ml) se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. A esta mezcla se le agregó cuidadosamente una solución de ácido *N-malol*-3-at-aminopropiónico (233,8 mg, 1,38 mmol), diisopropiletilamina (13,94 mL), cianofosfonato de dietilo (306,57 ml, 1,81 mmol) y diclorometano (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se vertió en agua (20 ml) y la capa acuosa. Se extrae con diclorometano (tres veces 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. La mezcla bruta se purificó por HPLC para dar el compuesto del título. ESI-MS (M+1) 649.

Ejemplo 3

Paso A

N-3-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)propil)pivalamida

[0131]

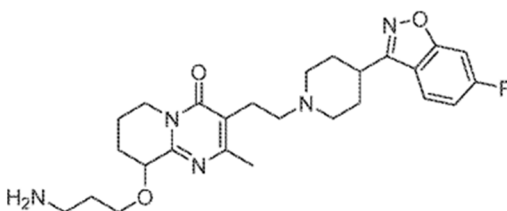


[0132] Una solución de paliperidona (746,26 mg, 1,75 mmol) en THF (15 ml) se trató con bromuro de 3-(Boc-amino)propilo (500 mg, 2,10 mmol), 18-Corona-6 (231,25 mg, 0,874 mmol) e hidruro de sodio (60% p/p, 139,97 mg, 3,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. El disolvente se eliminó al vacío, se disolvió en diclorometano/agua (50 ml/50 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (tres veces 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto del título, que se usó sin purificación adicional en el siguiente paso.

Paso B

9-(3-aminopropoxi)-3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona

[0133]



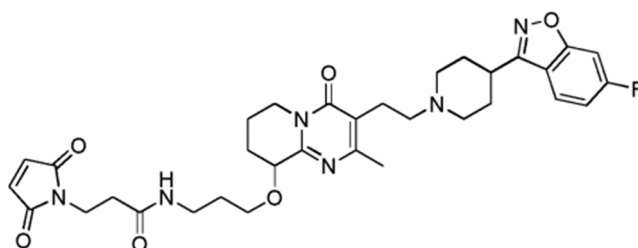
[0134] Una solución de N-3-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)propil)pivalamida, preparada como se describe en el Paso A, (1,482 g, 2,54 mmol) en diclorometano (10 ml) y el ácido trifluoroacético (5 ml) se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó en una columna Porapak CX para dar el compuesto del título que se usó sin purificación

adicional en el siguiente paso.

Paso C

- 5 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(3-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)propilo)propanamida

[0135]

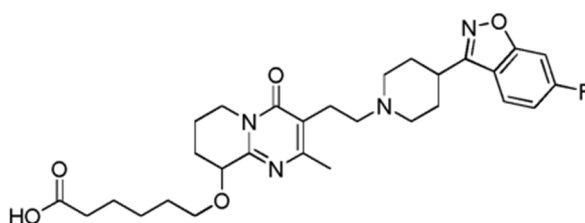


- 20 [0136] Una solución de 9-(3-aminopropoxi)-3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona, preparado como se describe en el Paso B, (0,303 g, 0,627 mmol) en diclorometano (5 ml), bajo argón, se trató con diisopropiletilamina (218,54 μ L, 1,25 mmol), *N*-malolil-3-ácido aminopropiónico (163,88 mg 0,940 mmol) y cianofosfonato de dietilo (159,19 μ L, 0,940 mmol). Después de 18 h, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (tres veces 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. La mezcla bruta se purificó por HPLC para dar el compuesto del título. ESI-MS ($M+1$) 635.

Ejemplo de referencia 4

- 30 6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metilo-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)ácido hexanoico

[0137]



- 45 [0138] Una solución de paliperidona (1,0 g, 2,34 mmol) en THF (15 ml), en atmósfera de argón, se trató con 18-Corona-6 (309,88 mg, 1,17 mmol), acetato de 6-bromohexanoato (628,76 μ L, 3,52 mmol) e hidruro de sodio (60% p/p, 937,80 mg, 23,45 mmol). Después de 18 h, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (tres veces 20 ml). La capa acuosa se acidificó con ácido acético y se extrajo con 2-metil THF (tres veces 20 ml). Las capas de THF orgánicas de 2-metil combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC para dar el compuesto del título. ESI-MS ($M+1$) 541. ^1H RMN: (CDCl_3 , 360 MHz): δ ppm 1,35-2,00 (m, 11H), δ 2,10 a 2,30 (m, 8H), δ 2,40-2,80 (m, 8H), δ 3,20-4,00 (m, 5H), δ 4,24 a 4,30 (m, 1H), δ 7,07 (td, $J = 8,97, 1,83$ Hz, 1H), δ 7,24 (d, $J = 1,83$ Hz, 1H), δ 7,76 (dd, $J = 8,60, 4,94$ Hz, 1H).

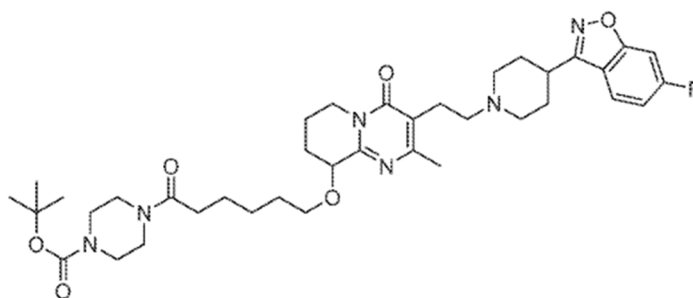
55 Ejemplo 5

Paso A

- 60 4-(6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)hexanoil)piperazin-1-carboxilato de *tert*-butilo

[0139]

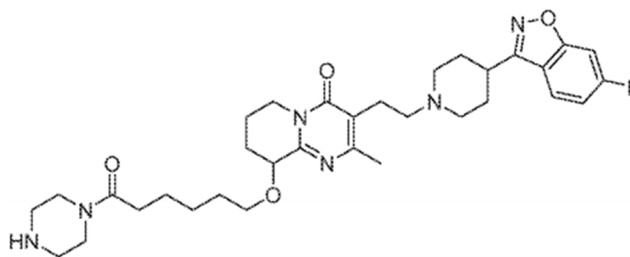
65



[0140] Una solución del Ejemplo 4 (200 mg, 0,37 mmol) en diclorometano (10 ml), en atmósfera de argón, se trató con *N*-*t*-butoxicarbonilpiperazina (89,57 mg, 0,48 mmol) y diisopropiletilamina (77,42 μ L, 0,44 mmol). A la solución en agitación, se le añadió cianofosfonato de dietilo (72,06 μ L, 0,43 mmol). Después de agitarse durante dos horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en agua (20 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (tres veces 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. Se utilizó la mezcla cruda sin más purificación en el siguiente paso. (408 mg, ESI-MS ($M+1$) 709)

Paso B

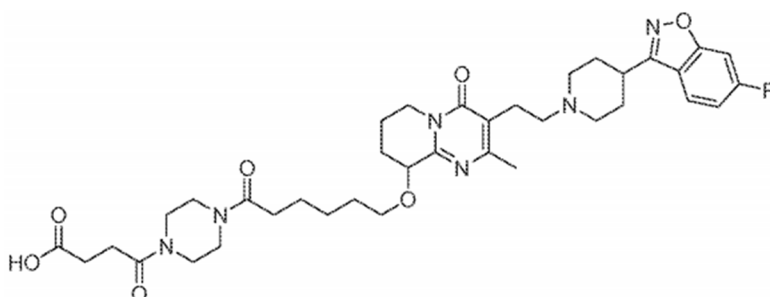
3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-9-((6-oxo-6-(piperazin-1-il)hexil)oxi)-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona



[0142] Una solución de 4-(6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)hexanoil)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo, preparada como se describe en el paso A, (408 mg, 0,58 mmol) en diclorometano (5 ml), bajo argón, se trató con ácido trifluoroacético (435,62 μ L, 5,8 mmol). Después de agitarse durante 72 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (5 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (tres veces 5 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. El producto bruto se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. (ESI-MS ($M+1$) 609)

Paso C

4-(4-(6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)hexanoil)piperazin-1-il)-4-ácido oxobutanoico



[0144] Una solución de 3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-9-((6-oxo-6-(piperazin-1-il)hexil)oxi)-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona, preparada como se describe en el Paso B, (239 mg, 0,39 mmol) en diclorometano (5 ml), bajo argón, se trató con anhídrido succínico (43,15 mg, 0,43 mmol) y

diisopropiletilamina (68,35 µl, 0,39 mmol). Después de agitarse durante 2 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en agua (5 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano/metanol (95/5, tres veces 5 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC y se trituró con diisopropiléter, para dar el compuesto del título. (ESI-MS (M+1) 709); ¹H RMN: (CDCl₃, 360 MHz): δ ppm 1,10-2,80 (m, 31H), δ 3,20-4,00 (m, 13H), δ 4,24-4,30 (m, 1H), δ 7,07 (td, J = 8,97, 1,83 Hz, 1H), δ 7,24 (d, J = 1,83 Hz, 1H), δ 7,76 (dd, J = 8,60, 4,94 Hz, 1H)

Ejemplo 6

3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(3-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)propil)propanoamida - conjugado de hemocianina de lapa californiana

[0145] A una solución 4,22 ml de hemocianina de lapa californiana (KLH, 18,0 mg, 0,18 µmoles) en tampón fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, pH 7,4 se añadió 83,2 µl de una solución de DMF de N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA, 25 mg/ml, 2,1 mg, 9,0 µmoles). La solución resultante se incubó a 20°C durante 1 hora en un mezclador de rodillos. La reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, EDTA 5 mM, pH 6,0. A 9,37 ml de KLH-SATA (17,1 mg, 0,171 µmoles) se añadió 937 µl de 2,5 M de hidroxilamina, EDTA 50 mM, pH 7,0. La solución resultante se incubó a 20°C durante 40 minutos en un mezclador de rodillos. La reacción se usó como tal en reacción de conjugación con hapteno activado con maleimida.

[0146] Al KLH-SH del Paso 1 (10,3 ml, 0,171 µmoles) se añadió 770 µl de una solución de DMF de 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(3-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)propil)propanamida (preparada como se describe en el Ejemplo 3, 10 mg/ml, 12,1 µmoles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 4 horas a 20°C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm, 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 de referencia 7

6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)ácido hexanoico- conjugado de tiroglobulina bovina

[0147] Una solución de 6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)ácido hexanoico (preparado como se describe en el Ejemplo de referencia 4, 5,0 mg, 9,3 µmoles), N-hidroxisuccinimida (NHS, 3,9 mg, 34,2 µmoles) y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 7,1 mg, 34,2 µmoles) en 300 µl de DMF y 3 µl de tributilamina se dejó en agitación durante 18 horas a 20°C. Una alícuota de 30 µl (30 µL, 9,3 µmol) de la solución resultante se añadió a 1,52 ml de una solución de tiroglobulina bovina (BTG, 7,6 mg, 0,011 µmoles) en 100 µM de tampón de fosfato de pH 7,5. La mezcla turbia resultante se incubó a 20°C durante 3 horas en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm, seguido de purificación en una columna Sephadex G-25 usando tampón fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

Ejemplo 8

4-(4-(6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)hexanoil) piperazin-1-il)-4-oxobutanoico - conjugado de hemocianina de lapa californiana

[0148] Una solución de 4-(4-(6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)hexanoil) piperazin-1-il)-4-ácido oxobutanoico (preparado como se describe en el ejemplo 5, 10,6 mg, 15,0 µmoles), N-hidroxisuccinimida (NHS, 6,4 mg, 55,5 µmoles) y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 11,5 mg, 55,5 µmoles) en 400 µl de DMF y 4 µl de tributilamina se dejó en agitación durante 18 horas a 20°C. Una alícuota de 81 µl (3,0 µmoles) de la solución resultante se añadió a 2,75 ml de una solución de hemocianina de lapa californiana (KLH, 12,0 mg, 0,12 µmoles) en tampón fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, a pH 7,4. 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 jeringa de 0,45 µm, luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, a pH 7,4.

Ejemplo 9

4-(4-(6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)hexanoil)piperazin-1-il)-4-ácido oxobutanoico - conjugado de tiroglobulina bovina

[0149] Una solución de 4-(4-(6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)hexanoil)piperazin-1-il)-4-oxobutanoico (preparado como se describe en el ejemplo 5, 17,1 mg, 24,1 µmoles), N-hidroxisuccinimida (NHS, 10,3 mg, 89,3 µmoles) y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 18,4 mg, 89,3 µmoles) en 600 µl de DMF y 6 µl de tributilamina se dejó en agitación durante 18 horas a 20°C.

Una alícuota de 462 µl (18,4 µmoles) de la solución resultante se añadió a 3,0 ml de una solución de tiroglobulina bovina (BTG 15,0 mg, 0,023 µmoles) en 100 mM de tampón fosfato pH 7,5. 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 jeringa de 0,45 µm, luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

Ejemplo 10

Inmunoensayo competitivo para paliperidona

[0150] Tras una serie de inmunizaciones con inmunógenos de paliperidona/risperidona, se analizaron las hemorragias de la cola del ratón para reactividad utilizando un ELISA. Los sobrenadantes de hibridoma también se analizaron, y los datos de ELISA que se muestran en las Tablas 1 y 2 a continuación muestran la reactividad de varios hibridomas (la pareja de fusión fue células NSO). Como se muestra en la Tabla 2, se observó la reactividad de los hibridomas 2A5 y 5G11.

Tabla 1

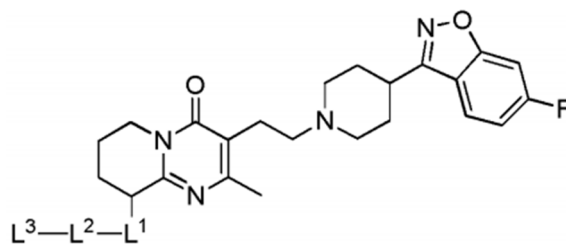
Dilución															Blanco		Ag. = 0.05 g/l																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1

[0151] Después de identificarse clones a través de la reactividad ELISA, ELISA de competición se corrieron para aproximar afinidad y reactividad cruzada con compuestos similares. Las FIGS. 1 y 2 muestran los resultados de reactividad cruzada de ELISA a partir del subclón 5_9 de hibridoma. Los datos muestran la reactividad a la risperidona, así como a sus metabolitos paliperidona y 7-hidroxirisperidona. Los sobrenadantes también fueron ensayados por ELISA de competición para determinar si las señales eran específicas de risperidona o paliperidona. La FIG. 3 muestra los resultados del subclón 2A5 de hibridoma. Los datos muestran la reactividad tanto a la risperidona como a la paliperidona.

[0152] La FIG. 4 muestra el formato de inmunoensayo competitivo utilizado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral en el que el anticuerpo de captura, risperidona/paliperidona, clon 5-9, se depositó en un chip junto con un conjugado de detección que consiste en la risperidona conjugada a un fluoróforo. En este formato competitivo como se muestra en la FIG. 4, un nivel bajo de analito (paliperidona) da como resultado una señal alta, mientras que un nivel alto de analito (paliperidona) da como resultado una señal baja. La cantidad de paliperidona en la muestra puede calcularse a partir de la pérdida de fluorescencia en comparación con una muestra de control sin fármaco presente. Una curva de respuesta de dosis típica generada con clon 5-9 de risperidona/paliperidona se muestra en la FIG. 5.

REIVINDICACIONES

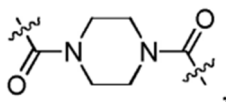
1. Los compuestos de Fórmula I



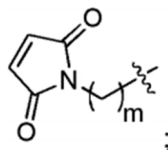
Formula I

en donde

L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, o $O(CH_2)_n$;
en donde n es 1, 2 o 3;
 L^2 es $NHC(O)$,

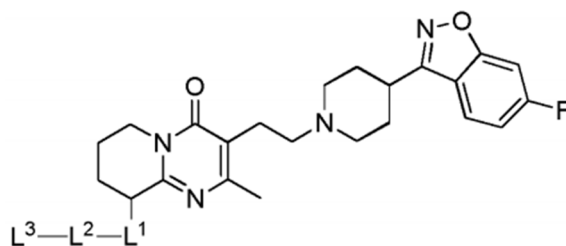


o está ausente;
 L^3 es



en donde m es 0, 1, 2, o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L^2 está ausente.

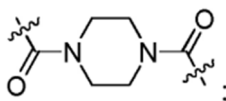
2. Los compuestos de Fórmula I



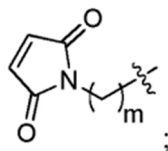
Formula I

en donde

L^1 es $OC(O)(CH_2)_n$, o $O(CH_2)_n$;
en donde n es 1, 2 o 3;
 L^2 es $NHC(O)$, o



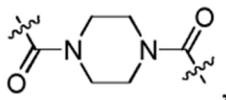
L^3 es $(CH_2)_mCO_2H$, o



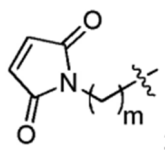
en donde m es 1, 2, o 3, 3.

3. El compuesto de la Reivindicación 1, en donde

5 L¹ es OC(O)(CH₂)_n, o O(CH₂)_n;
en donde n es 1, 2 o 3;
L² es NHC(O),



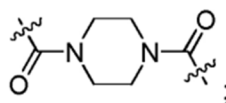
o está ausente;
L³ es



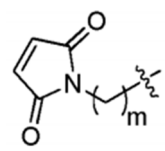
en donde m es 0, 1, o 2; siempre que m solo pueda ser 0 si L² está ausente.

4. El compuesto de la Reivindicación 2, en el que

25 L¹ es OC(O)(CH₂)_n, o O(CH₂)_n;
en donde n es 1, 2 o 3;
L² es NHC(O), o

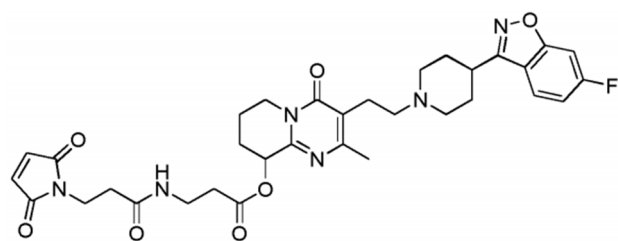


L³ es (CH₂)_mCO₂H, o

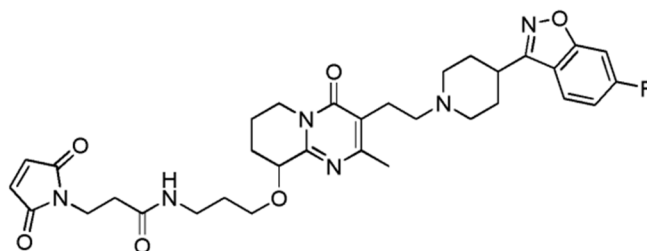


en donde m es 1, o 2.

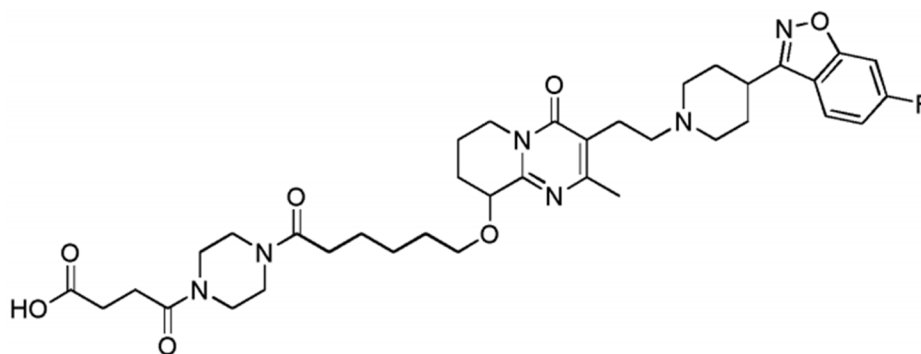
5. El compuesto de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, que es:



o



6. Un compuesto que es:



7. Un conjugado de un compuesto de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 y un portador inmunogénico.

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

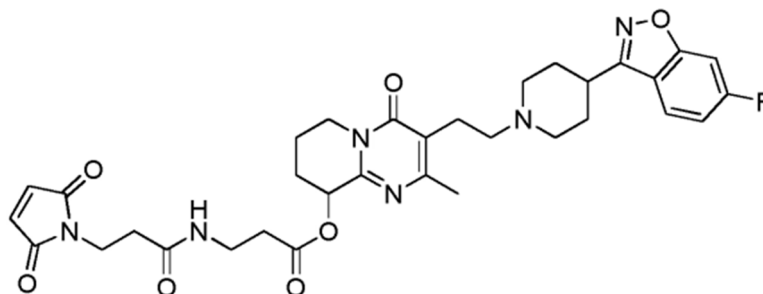
9. El conjugado de la Reivindicación 8, en el que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina u ovoalbúmina.

10. Un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto el compuesto de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 con un portador inmunogénico.

11. El producto de la Reivindicación 10, en el que el portador inmunogénico es una proteína.

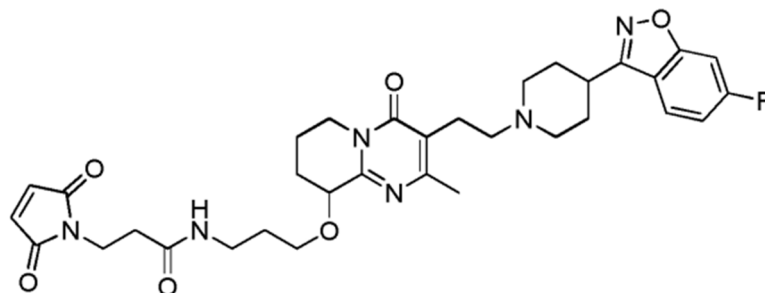
12. El producto de la Reivindicación 11, en el que dicha proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina u ovoalbúmina.

13. Un producto hecho por el proceso de contacto con un compuesto que es



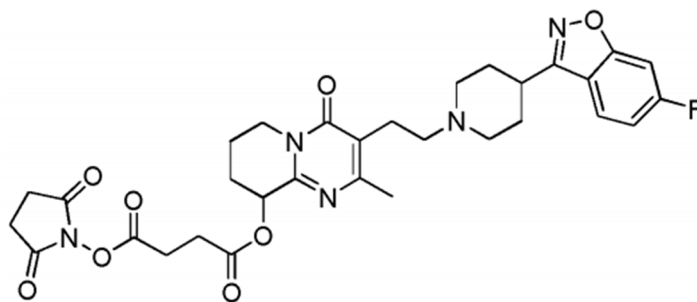
con una proteína.

14. Un producto hecho por el proceso de poner en contacto un compuesto que es



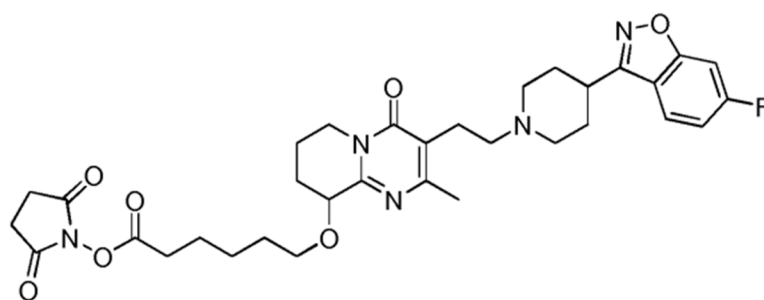
con una proteína.

15. Un producto hecho por el proceso de poner en contacto un compuesto que es



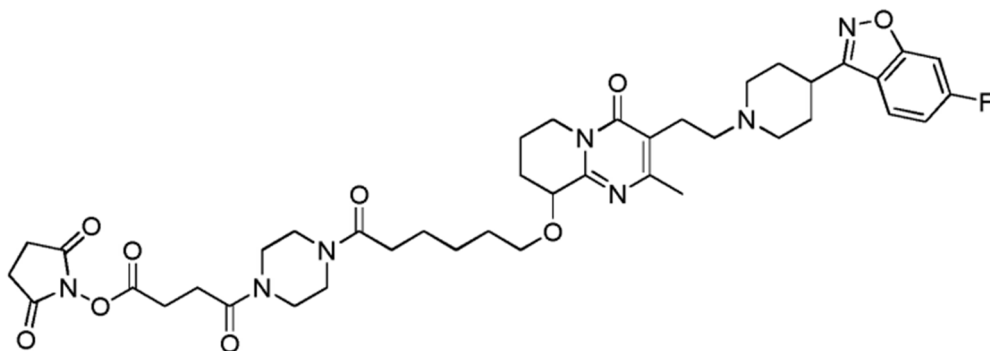
con una proteína.

16. Un producto hecho por el proceso de poner en contacto un compuesto que es



con una proteína.

17. Un producto hecho por el proceso de poner en contacto un compuesto que es



con una proteína.

18. El producto de una cualquiera de las Reivindicaciones 13-17, en el que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina u ovoalbúmina.

Fig. 1

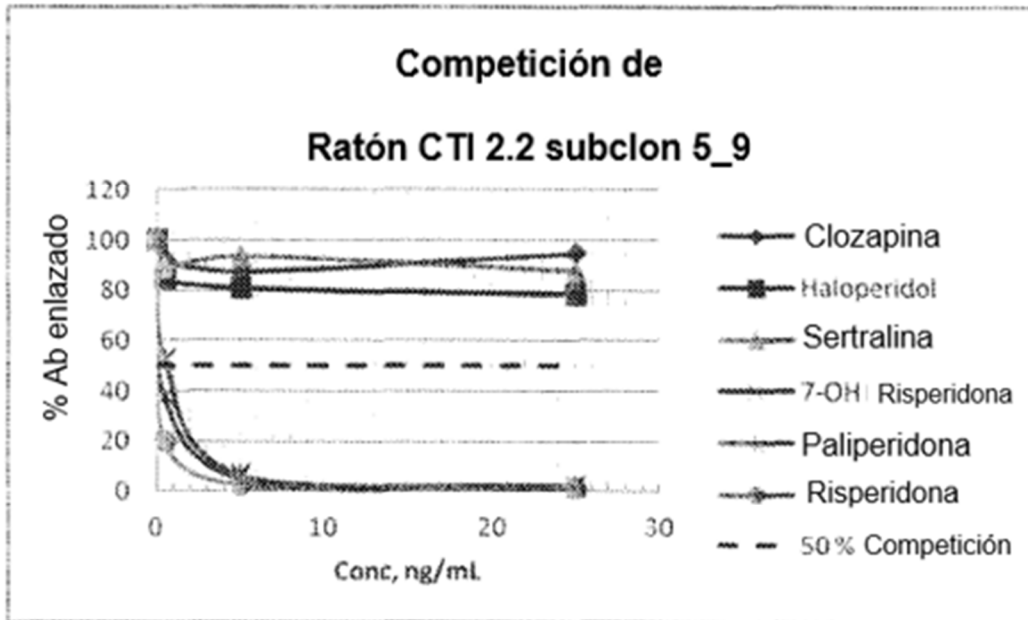


Fig. 2

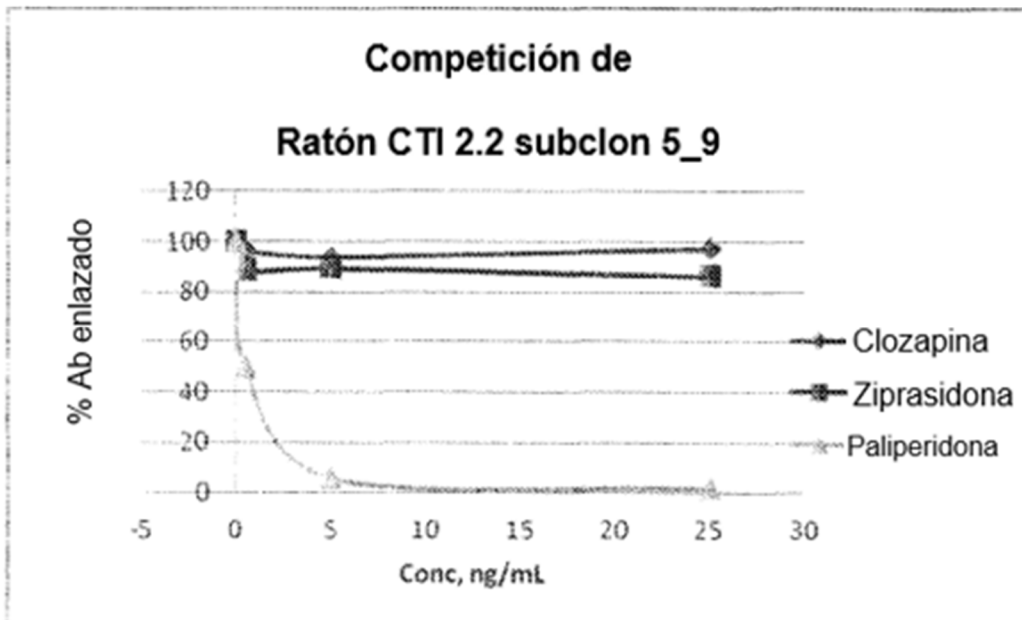


Fig. 3

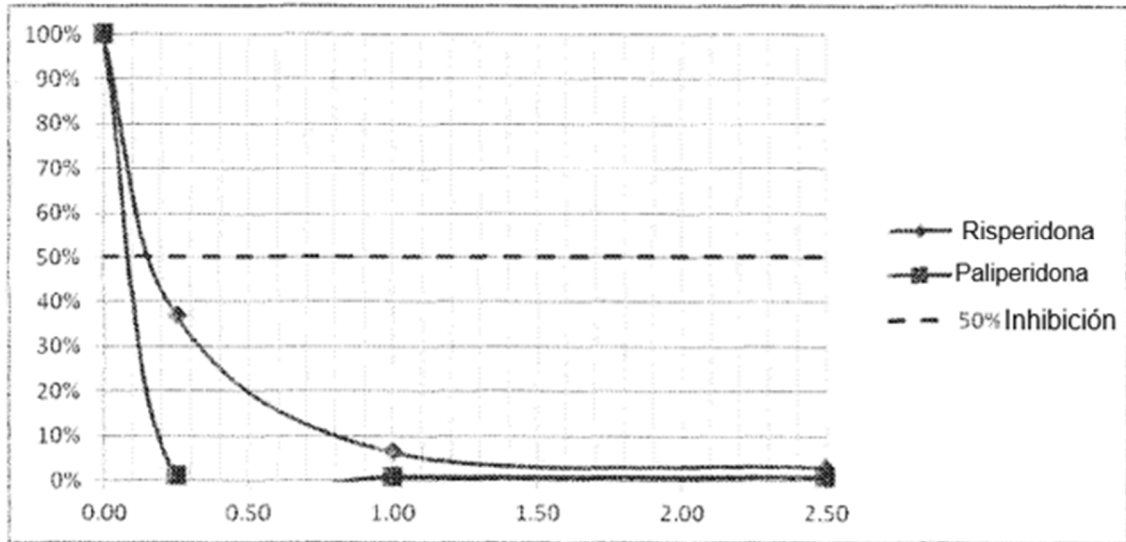


Fig. 4

Formatos competitivos: Ab Down

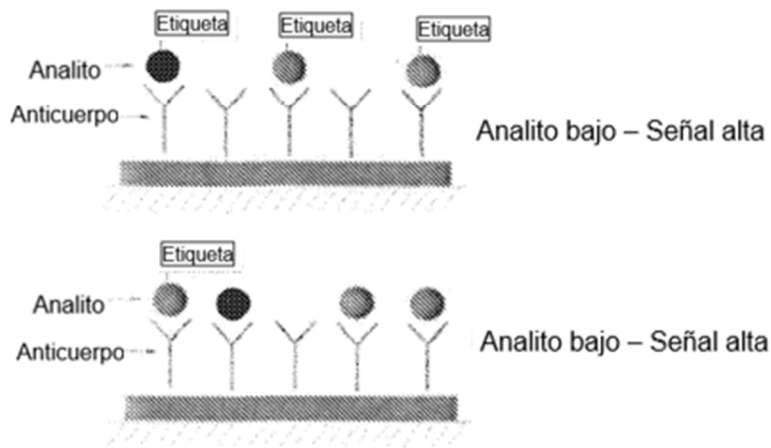


Fig. 5

