



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 146**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

C07D 307/88 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

C07D 473/08 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

G01N 33/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00941723 .9**

86 Fecha de presentación : **26.06.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1105730**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2001**

54 Título: **Inmunoensayo de inhibición de enzimas.**

30 Prioridad: **25.06.1999 US 141098 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Roche Diagnostics Operations, Inc.**
9115 Hague Road, P.O. Box 50416
Indianapolis, Indiana 46250-0416, US
Roche Diagnostics GmbH

72 Inventor/es: **Dorn, Allan, R.;**
Salamone, Salvatore, J.;
Ghoshal, Mitali;
Hoess, Eva;
Huber, Erasmus;
Hawley, Ronald, C. y
Patterson, John, W.

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Inmunoensayo de inhibición de enzimas.

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere en general al ámbito de la determinación de un analito en un medio líquido. Se refiere más en concreto a un inmunoensayo para medir un analito en una muestra biológica.

10 Boguslaski, R.C. y col., patente US-4,134,792 (1979), describen el uso de un modulador de enzima, que se fija de modo reversible, como sustancia marcadora para la detección de un analito en un medio líquido y, en particular, el uso de inhibidores competitivos unidos a un análogo del analito en los inmunoensayos.

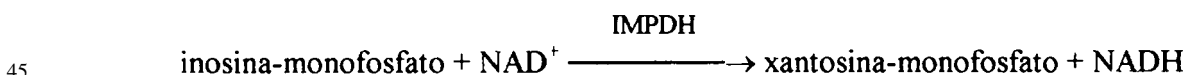
15 Dorn, A.R., U.S. nº de serie 09/328,741, depositado con fecha 9 de junio de 1999, describe un método para medición enzimática del ácido micofenólico en una muestra biológica.

La inosina-5'-monofosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.205) cataliza la oxidación, dependiente de la NAD, del inosina-5'-monofosfato (IMP) en el xantosina-5'-monofosfato (XMP), Magasanik, B. y col., J. Biol. Chem. 226, 339-350, 1957 y Jackson y col., Nature 256, 331-333, 1975. La enzima sigue una secuencia de reacciones ordenada Bi-Bi de fijación del sustrato y cofactor y de liberación de producto. En primer lugar, la IMP se fija sobre la IMPDH. Después sigue la fijación sobre el cofactor NAD. El cofactor reducido, la NADH, se libera seguidamente separándose del producto, después sigue el producto, el XMP. Este mecanismo difiere del de las deshidrogenasas más conocidas, dependiente de la NAD, que tiene una adición al sustrato de orden aleatorio o bien requiere que la NAD se fije antes sobre el sustrato.

25 Se han identificado y secuenciado dos isoformas de la IMPDH humana, denominadas tipo I y tipo II, véase Collart y col., J. Biol. Chem. 263, 15769-15772, 1988 y Natsumeda y col., J. Biol. Chem. 265, 5292-5295, 1990. Cada isoforma tiene 514 aminoácidos y ambas isoformas comparten una identidad de secuencia del 84%. Los tipos tipo I y tipo II de la IMPDH forman tetrámeros activos en solución, con pesos moleculares de subunidad de 56 kDa, Yamada y col., Biochemistry 27, 2737-2745, 1988.

Resumen de la invención

35 En su aplicación más estricta, la presente invención se ejemplifica con un inmunoensayo homogéneo cuantitativo, específico del ácido micofenólico, basado en la inhibición específica no competitiva de la enzima inosina-5'-monofosfato-deshidrogenasa (IMPDH) por acción del ácido micofenólico. La inhibición de la IMPDH depende solamente de la concentración del ácido micofenólico, debido a la naturaleza no competitiva de la inhibición causada por el ácido micofenólico. Por lo tanto, cuanto mayor sea la concentración del ácido micofenólico, tanto mayor será la inhibición de la enzima. Midiendo la formación del dinucleótido nicotinamida-adenina reducida (NADH) a 340 nm 40 se puede hacer el seguimiento de la reacción. La IMPDH cataliza la reacción siguiente:



50 El desarrollo de un inmunoensayo homogéneo puede efectuarse mediante la unión de un ligando a la posición 4' ó 5' del ácido micofenólico o de un derivado de MPA. En ausencia de analito, el anticuerpo específico del analito se fijará sobre el derivado ligando-MPA e impedirá su inhibición de la IMPDH. En presencia del analito, el analito se une a su anticuerpo, con lo cual deja en libertad al derivado ligando-MPA para que pueda inhibir a la IMPDH (tabla 3, parte C).

55 La velocidad de formación del NADH (dinucleótido de nicotinamida-adenina reducida) puede medirse haciendo el seguimiento del cambio de absorción en una longitud de onda de 340 nm, es decir, la región característica de absorción del NADH, y este cambio de absorción puede relacionarse seguidamente con la concentración del analito.

60 Las posiciones atractivas para la fijación del ligando se presentan en la cadena hexanoica del ácido micofenólico y sus derivados, en especial en los carbonos 4' y 5' (figura 1). Varios compuestos cumplen este criterio, véase Nelson, P.H. y col., Journal of Medicinal Chemistry 33, 833-838, 1990; Rohloff, J.C. y col., Tetrahedron Letters 36 (43), 7803-7806, 1995; Artis, D.R. y col., publicación PCT WO 95/22536 (1995) y Artis, D.R. y col., publicación PCT WO 95/22538 (1995). Varios derivados de este tipo producen una inhibición superior a la del ácido micofenólico y por ello podrían impartir una mayor sensibilidad a un inmunoensayo homogéneo, véase Smith, D.B. y col., J. Org. Chem. 61, 2236-2241, 1996.

65 En una forma preferida de ejecución de la presente invención, el inhibidor no competitivo, el ácido micofenólico (MPA), se une a un ligando en la posición 4' ó 5' y se emplea en un inmunoensayo homogéneo del ácido micofenólico.

Se prefiere el uso de un conjuntado de inhibidor no competitivo-ligando al uso de un conjugado de un inhibidor competitivo-ligando, porque el primer conjugado es mucho menos susceptible de interferencias de otros fármacos y sustancias de origen natural, que habitualmente pueden ser inhibidores competidores de las enzimas. Los inhibidores no competitivos de enzimas son raros en la naturaleza y, por ello, serán menos susceptibles de interferencia por parte de fármacos y sustancias naturales.

En su aplicación más amplia, la presente invención puede utilizarse para medir cualquier analito. Aquí se especifica en especial el uso de la invención para la medición del ácido micofenólico, digoxigenina, tiroxina y teofilina. Se ha pensado también el uso de la invención para medir cualquier analito, incluidos los fármacos, derivados de fármacos, hormonas, polipéptidos y oligonucleótidos. Los ejemplos de otros fármacos o derivados de fármaco, que podrían ser idóneos para el ensayo aplicando el método de la presente invención, incluyen a los fármacos terapéuticos, por ejemplo antibióticos, p. ej., gentamicina, ampicilina, tobramicina, netilmicina y vancomicina; los fármacos cardíacos, p. ej., digoxina, digitoxina, N-acetil-procainamida, procainamida, quinidina y lidocaína; fármacos anti-apoplejía, p. ej., fenitoína, fenobarbital, primidona, ácido valproico, etosuximida y carbamazepina; analgésicos, p. ej., acetaminofeno y ácido acetilsalicílico; y inmunosupresores, p. ej., MPA, ciclosporina, rapamicina (sirolimus) y FK506 (tacrolimus) y fármacos de abuso, como son las anfetaminas, barbituratos, benzodiazepinas, cannabinoides, metabolitos de cocaína (benzoilecgonina), metadona, opiáceos, fenciclidina, propoxifeno y LSD. Los ejemplos de hormonas que podrían ser idóneas para el ensayo aplicando el método de la presente invención incluyen la tiroxina, la hormona estimuladora del tiroides, estrógeno, progesterona, testosterona, prolactina, hormona estimuladora de folículo, gonadotropina coriónica y hormona luteinizante. Los ejemplos de polipéptidos que podrían ser idóneos para el ensayo aplicando el método de la presente invención incluyen a las proteínas y epítopes, por ejemplo la hemoglobina A1c, la troponina-T y troponina-I. Los ejemplos de oligonucleótidos que podrían ser idóneos para el ensayo aplicando el método de la presente invención incluyen a secuencias específicas de oligonucleótidos que pueden hibridarse en condiciones estrictas con secuencias suficientemente específicas para la detección y cuantificación de la gonorrea, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la *Chlamydia* y las infecciones de hepatitis.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de ensayo para realizar la determinación de un analito por el método de la presente invención que contiene, en una combinación envasada, una o más composiciones de reactivos, que contienen el NAD, la IMPDH, el IMP y un conjugado 4' o 5' que contiene el MPA y un analito o sustancia, que se comporta esencialmente igual que el analito en lo que respecta a la afinidad de fijación del anticuerpo con el analito.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se ilustra la estructura del ácido micofenólico y la estructura del conjugado ligando-inhibidor, MPA-MPA (bis-MPA).

La figura 2 es una representación gráfica de los resultados obtenidos en el ejemplo 20, en el que se ensayan con arreglo a la presente invención muestras que contienen tiroxina. Se representa la concentración de la tiroxina en el eje X y se representa la delta de la absorbancia (o punto final) a 340 nm en el eje Y.

La figura 3 es la representación gráfica de los resultados obtenidos en el ejemplo 23, en el que se ensayan con arreglo a la presente invención muestras que contienen digoxigenina. Se representa la concentración de la digoxigenina en el eje X y se representa la delta de la absorbancia (o punto final) a 340 nm en el eje Y.

La figura 4 es la representación gráfica de los resultados obtenidos en el ejemplo 26, en el que se ensayan con arreglo a la presente invención muestras que contienen digoxigenina. Se representa la concentración de la digoxigenina en el eje X y se representa la relación de absorbancia a 340 nm en el eje Y.

La figura 5 es la representación gráfica de los resultados obtenidos en el ejemplo 29, en el que se ensayan con arreglo a la presente invención muestras que contienen teofilina. Se representa la concentración de la teofilina en el eje X y se representa la relación de absorbancia a 340 nm en el eje Y.

En la figura 6 se ilustra la obtención del éster metílico del ácido 5'-isoprenil-[OH]-MPA [OMEM] del modo descrito en los ejemplos 4, 5, 6 y 7.

En la figura 7 se ilustra la obtención del conjugado del éster metílico del ácido 5'-[isopreniloxycarbonilaminoetileno-amido]-tiroxina-(N-t-Boc)-MPA [OMEM] del modo descrito en los ejemplos 8, 9 y 10.

En la figura 8 se ilustra la obtención de la L-tiroxina-(N-t-Boc)-amidoetilenoamina del modo descrito en el ejemplo 9.

En la figura 9 se ilustra la obtención del conjugado de 5'-[(isopreniloxycarbonilamino-etilenoamido)-tiroxina]-MPA del modo descrito en los ejemplos 11 y 12.

En la figura 10 se ilustra la obtención del éster t-butilico del ácido 5'-carboximetil-MPA del modo descrito en los ejemplos 13, 14 y 15.

ES 2 298 146 T3

En la figura 11 se ilustra la obtención del conjugado del éster t-butilico del ácido 5'-(digoxigenin-3-il- β -amidometil)-MPA del modo descrito en el ejemplo 16.

En la figura 12 se ilustra la obtención del conjugado del ácido 5'-(digoxigenin-3-il- β -amidometil)-MPA, isómero A e isómero B, del modo descrito en el ejemplo 17.

En las figuras 13 y 14 se ilustra la obtención del ácido 4'-(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA, del modo descrito en los ejemplos 31 y 32.

En la figura 15 se ilustra la obtención del conjugado del ácido 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilamino-carboniloxi)-isoprenil]-MPA [OMEM] del modo descrito en el ejemplo 33.

En la figura 16 se ilustra la obtención del ácido 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)-isoprenil]-MPA del modo descrito en el ejemplo 35.

En la figura 17 se ilustra la obtención del éster metílico del ácido 5'-(succinimido-N-oxi)carbonilmetil-MPA del modo descrito en los ejemplos 36, 37, 38 y 39.

En la figura 18 se ilustra la obtención del ácido 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA del modo descrito en los ejemplos 40 y 41.

Descripción detallada de la invención

Se ha constatado que el ácido micofenólico tiene algunas propiedades de inhibición de la IMPDH que podrían facilitar el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos homogéneos. La sensibilidad de la inhibición del ácido micofenólico (10-20 nM) y su inhibición no competitiva favorece su utilización en inmunoensayos enzimáticos homogéneos. Mediante la unión cuidadosa de un ligando con el ácido micofenólico para formar un conjugado de ligando-inhibidor, se pueden desarrollar inmunoensayos enzimáticos homogéneos para un analito específico. La unión de un ligando y un inhibidor no competitivo es preferida en gran manera en el caso concreto de la medición del ácido micofenólico, porque existen muchos inhibidores competitivos del IMP y la NAD que podrían reducir la especificidad del ensayo. En general, el uso de inhibidores competitivos en conjugados de ligando-inhibidor conducirá a interferencias en la resolución del ensayo, ya que muchos fármacos y sustancias de origen natural actúan como inhibidores competitivos, que podrían reducir mucho la especificidad.

Un inhibidor no competitivo de la enzima IMPDH es una sustancia que inhibe, mediante la ocupación del sitio activo de la enzima, y no compite con el IMP ni la NAD en cuanto a inhibir la enzima. La inhibición no competitiva tiene lugar cuando un inhibidor se combina de modo reversible con el complejo de IMPDH-XMP en el sitio activo de la enzima para formar un complejo IMPDH-XMP-inhibidor, que entonces es incapaz de liberar el producto XMP. Este tipo de inhibición no se invierte aumento la concentración del sustrato. La NADH se libera solo una vez, mientras que el XMP no se libera. Por otro lado, los inhibidores no competitivos se fijan sobre un sitio, que es diferente del sitio de fijación del sustrato. La inhibición no competitiva tampoco se invierte cuando aumenta la concentración del sustrato.

La enzima IMPDH para este uso es una enzima IMPDH-II recombinante de linfocitos T humanos.

La sensibilidad del presente inmunoensayo frente a la concentración del analito puede modificarse con el uso de diferentes formas de la IMPDH que varían en cuanto a sensibilidad a la inhibición causada por el MPA. Por ejemplo, las constantes de inhibidor (K_i) de varias formas de la IMPDH humana frente al MPA son las siguientes:

forma de IMPDH	K_i (IC ₅₀)	Referencia
IMPDH-I	37 nM	J. Biol. Chem. <u>268</u> , 27286-27290, 1993
IMPDH-II	9,5 nM	J. Biol. Chem. <u>268</u> , 27286-27290, 1993
IMPDH-II ser275→ala275	4 nM	Cell <u>85</u> , 921-930, 1996

Dados que las diferentes formas de enzima tienen distintas sensibilidades frente a la inhibición por el MPA, deberían tener también distintas sensibilidades frente a la inhibición causada por ligandos-inhibidores y, de este modo, tener utilidad para realizar inmunoensayos con diferentes niveles de sensibilidad e intervalos de medición de analitos.

La invención permite ajustar la sensibilidad del ensayo. El ajuste o modificación de la sensibilidad del ensayo no puede conseguir fácilmente sin usar diferentes formas de la IMPDH de sensibilidades diversas frente al MPA o a derivados del MPA o cualquier otro inhibidor no competitivo de la IMPDH.

Muestras, de las que se supone que pueden contener un analito: por el método de la presente invención puede analizarse cualquier muestra de la que se pueda sospechar razonablemente que contiene un analito. Es típico que la muestra se presente en forma de solución acuosa, por ejemplo un fluido corporal procedente de un hospedante, por ejemplo la orina, la sangre total, el plasma, el suero, la saliva, el semen, las heces, el esputo, el líquido cerebroespinal, las lágrimas, el moco o similares, pero con preferencia el plasma o el suero. Si se desea, la muestra puede tratarse previamente y prepararse en cualquier medio conveniente, que no interfiere en el ensayo. Es preferido un medio acuoso.

Medición de la cantidad de ácido micofenólico: se consideran métodos para medir la cantidad de ácido micofenólico los métodos cuantitativos, semi-cuantitativos y cualitativos así como otros métodos diversos. Por ejemplo, un método que solamente detecta la presencia o ausencia del ácido micofenólico en una muestra, de la que se sospecha que contiene ácido micofenólico, se considera incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos “detectar” y “determinar” así como otros sinónimos habituales de medir están contemplados dentro del alcance de la presente invención.

La determinación del MPA según la presente invención puede efectuarse por un método de ensayo-conversión, en el que se mide el cambio de absorbancia de la NADH por unidad de tiempo o por un método de punto final, en el que la reacción se extingue después de haber transcurrido un cierto período de tiempo. El método puede aplicarse fácilmente con máquinas analizadoras automáticas de análisis de laboratorio o clínicos. Los ejemplos de analizadores automatizados de laboratorio con los analizadores de los tipos COBAS INTEGRA y ROCHE/HITACHI (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Se contemplan también otros métodos para analizar la NADH, por ejemplo, la reducción de la NAD y posterior reducción de la sal tetrazolio, cloruro de 2-p-nitrofenil-5-fenil-tetrazolio (INT), con metosulfato de fenazina que actúa como compuesto intermedio portador de electrones, tal como describen Babson, A.L. y col., *Clinical Chemistry* 19 (7), 766-769, 1973.

Material de calibración significa cualquier material estándar o de referencia que contiene una cantidad conocida del analito a medir. La muestra, de la que se sospecha que contiene el analito, y el material de calibración se ensayan en las mismas condiciones. Después se calcula la concentración de analito comparando los resultados obtenidos con la muestra desconocida con los resultados obtenidos con el patrón. Esto se realiza normalmente trazando una curva de calibración, por ejemplo la representada en las figuras 2, 3, 4 y 5.

Materiales auxiliares: en los ensayos de la presente invención se utilizarán con frecuencia diversos materiales auxiliares. Por ejemplo, normalmente estarán presentes tampones en el medio de ensayo, así como estabilizadores de dicho medio y de los componentes de ensayo. Además de estos aditivos se emplearán con frecuencia proteínas adicionales, por ejemplo albúmina, o tensioactivos, en particular tensioactivos no iónicos, o similares.

Con IMPDH se indica la enzima inosina-5'-monofosfato-deshidrogenasa, EC 1.1.1.205, que cataliza la formación del xantina-5'-monofosfato a partir del inosina-5'-monofosfato. La presente invención contempla el uso de la IMPDH procedentes de fuentes naturales o recombinantes o de mutantes dirigidos a sitio, y puede utilizarse cualquier isoforma, mutante dirigido a sitio o una mezcla de isoformas.

Se da por supuesto que cualquier referencia de esta descripción o reivindicaciones al ácido micofenólico abarca al ácido micofenólico así como a sus metabolitos y derivados biológica y terapéuticamente activos, es decir, a través de la inhibición de la IMPDH, en forma de ácido micofenólico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a kits que son útiles para llevar a la práctica de modo conveniente los métodos de ensayo de la invención para la determinación de un analito. Para ampliar la versatilidad de la invención de interés pueden proporcionarse los reactivos útiles para los métodos de la invención en una combinación envasada, en recipientes idénticos o separados, en forma líquida o liofilizada, de modo que la relación entre los reactivos proporcione una optimización sustancial del método y del ensayo. Los reactivos pueden estar en contenedores separados o bien pueden combinarse varios reactivos en uno o más contenedores, en función de la reactividad cruzada y de la estabilidad de los reactivos.

El kit de la presente invención consta de la NAD, un conjugado que contiene el MPA y un analito o sustancia, que se comporta esencialmente igual que el analito con respecto a la afinidad de fijación con el anticuerpo del analito, en el que el MPA está derivatizado en la posición 4' ó 5', el IMP y la IMPDH. Los reactivos pueden permanecer en forma líquida o pueden liofilizarse. El kit puede contener además materiales de calibración y control.

No obstante, la presente invención tiene aplicaciones más allá de la medición del ácido micofenólico. Aplicando la estrategia aquí descrita puede utilizarse cualquier ligando (por ejemplo, pero sin limitarse a ellos: la teofilina, la digoxina, la fenitoína, fragmentos de péptidos, oligonucleótidos, morfina, cocaína, etc.) que se haya derivatizado con un grupo reactivo apropiado para la fijación del ácido micofenólico o derivados del MPA oportunamente derivatizados en la posición 4' ó 5', para medir el analito correspondiente en una muestra desconocida. La derivatización de estas posiciones genera nuevos centros ópticamente activos. Los estereoisómeros se consideran dentro del alcance de la presente invención.

Una característica central de la presente invención es la capacidad de sintetizar derivados de MPA sustituidos en la posición 5' con un grupo de engarce apropiado, que puede extenderse para unirse a derivados de fármacos. Dos tipos

diferentes de grupos de engarce se describen en esta invención, los derivados farmacológicos del 5'-carboxi-alkuil-MPA y los derivados farmacológicos del 5'-isoprenil-engarce-MPA.

La sustitución en la posición 5' del éster del MPA implica una reacción de alquilación utilizando un halo-acetato de alkilo en presencia de bis(trimetilsilil)amida sódica y DMPU a una temperatura baja. El uso de la HMPA en lugar de la DMPU parece que mejora las reacciones de alquilación en general. Esta reacción de alquilación puede extenderse al uso de los halopropionatos de alkilo o halobutiratos de alkilo para obtener éster del ácido 5'-carboxietil-MPA o ésteres del ácido 5'-carboxipropil-MPA después de la hidrólisis selectiva del éster del engarce. Entonces, el grupo funcional carboxi del engarce permite una amplia variedad de vías de síntesis por conversión en un éster activo y después condensación para obtener derivados farmacológicos oportunamente derivatizados, con gran frecuencia un fármaco con un engarce que contiene un grupo amino para generar un enlace amida.

La sustitución en la posición 5' del éster del ácido MPA empleando un engarce bromo-isoprenilo (1) en presencia de la bis(trimetilsilil)amida sódica y HMPA proporciona el derivado 5'-isoprenil-TBDPS del MPA. Por hidrólisis del grupo TBDPS se obtiene el 5'-isoprenil-[OH]-MPA [OMEM] (5). Este alcohol es un compuesto intermedio clave que se activa por conversión en el carbonato de N-hidroxisuccinimidilo por tratamiento con carbonato de disuccinimidilo en presencia de trietil-amina. Se utiliza el carbonato activo sin aislar para unirse a fármacos modificados con amino, obteniéndose conjugados de fármaco de MPA con un enlace uretano. El enlace uretano puede conseguirse también por activación del alcohol con 1,1-carbonildiimidazol o cloroformiato de p-nitrofenilo y reacción de los compuestos intermedios con los derivados farmacológicos modificados con grupo amino. Esta síntesis puede extenderse a los conjugados farmacológicos de bis-isoprenil-MPA mediante el uso del bromo-bis-isoprenil-TBDPS. El bromo-bis-isoprenil-TBDPS puede sintetizarse a partir del derivado geraniol con arreglo al procedimiento de la bibliografía técnica descrito para el cloro-bis-isoprenil-TBDPS en J. Org. Chem. 62, 3529, 1997.

La inhibición de la IMPDH causada por el ácido micofenólico se ha descrito en Anderson, J.H. y col., Journal of Biological Chemistry 243 (18), 4762-4768, 1968. Se describen también inhibidores de la IMPDH en las patentes US-5,380,879, 5,444,072, 5,493,030, 5,536,747, 5,633,279 y 5,807,876 y en las publicaciones de patente PCT WO 94/01105 y WO 94/12184.

La clonación y la expresión de la IMPDH humana en *E. coli* se ha descrito en Konno, Y. y col., J. Biol. Chem. 266(1), 506-509, 1991. Collart, F.R. y col., patente US-5,665,583 (1997) describen también la clonación y la expresión de la IMPDH humana en *E. coli*.

Analito significa la sustancia o grupo de sustancias, cuya presencia o cantidad en un medio líquido se pretende determinar y se emplea para incluir cualquier fármaco o derivado farmacológico, hormona, proteína, antígeno u oligonucleótido. Analito significa cualquier sustancia o grupos de sustancias que se comportan esencialmente igual que el analito con respecto a la afinidad de fijación del anticuerpo con el analito y se emplea para incluir cualquier fármaco o derivado farmacológico e isómeros del mismo, hormona, polipéptido o nucleótido.

Anticuerpo o, con preferencia, receptor significa un reactivo de fijación específico del analito y es cualquier sustancia o grupo de sustancias que tiene una afinidad de fijación específica con el ligando que implica la exclusión de otras sustancias.

Un ejemplo de medición de un fármaco podría implicar la unión de derivados de tiocianato de morfina o de éster NHS de cocaína, descritos por Salamone, S.J. y col. en la patente US-5,618,926 (1997), con los derivados sustituidos por alquilamino en la posición 4' ó 5' del ácido micofenólico o derivados de MPA para medir la morfina o la cocaína en muestras desconocidas. Trazando la gráfica de la concentración de fármaco frente a la actividad de la IMPDH se puede obtener un ensayo cuantitativo.

La presente invención puede utilizarse también en diagnóstico molecular para determinar la presencia de un ADN o ARN diana específico. En este caso un conjugado de nucleótido y ácido 4'- ó 5'-micofenólico (N-MPA) podría ser capaz de inhibir la IMPDH, cuando esta no forma parte de una cadena de oligonucleótido. Una vez se ha incorporado el N-MPA a la cadena de un oligonucleótido, se puede modular la capacidad de la porción de ácido micofenólico del conjugado para inhibir la IMPDH.

El conjugado N-MPA puede obtenerse con arreglo a procedimientos bien conocidos de la técnica. El nucleótido puede derivatizarse a través del resto azúcar, base o fosfato de manera que permita convertirlo en un sustrato para enzimas, que sintetizan oligonucleótidos. Por ejemplo, una base de nucleótido derivatizado podría una prolongación que contuviera un electrófilo o nucleófilo. Entonces puede hacerse reaccionar este derivado con una molécula de MPA oportunamente derivatizada en la posición 4' ó 5' para formar un conjugado N-MPA.

El ensayo puede realizarse añadiendo un porcentaje de conjugado N-MPA a la mezcla de nucleótidos, que se emplearía para sintetizar el oligonucleótido. Se añadiría la muestra junto con las enzimas y sondas empleadas para polimerizar el oligonucleótido; las ADN- y ARN-polimerasas son ejemplos de tales enzimas polimerizadoras. Al finalizar el paso de la polimerización se añadiría la IMPDH junto con los reactivos apropiados para la IMPDH. Si la muestra no contiene la secuencia de oligonucleótido diana, entonces no tendría lugar la síntesis del oligonucleótido y el N-MPA quedaría libre para inhibir a la IMPDH. Si la secuencia diana está presente en la muestra, entonces la N-MPA se incorporaría al oligonucleótido y quedaría menos conjugado N-MPA disponible para inhibir a la IMPDH. La

concentración del N-MPA libre sería inversamente proporcional a la actividad de la IMPDH. Cuando menos N-MPA libre se genera, tanto mayor será la actividad de la IMPDH.

Este ensayo puede utilizarse tanto en base cualitativa como cuantitativa para determinar la presencia de moléculas de ADN o ARN diana concretas. La cantidad de material diana presente en la muestra será proporcional a la actividad de la IMPDH.

La modulación de la actividad de la IMPDH con derivados de MPA puede aplicarse también a la detección de antígenos de proteína. Puede derivatizarse un polipéptido corto, que constituya el epítipo o el mimítipo de un antígeno mayor, con arreglo a métodos ya conocidos de la técnica, para lograr un grupo que pueda unirse a una molécula de MPA derivatizada oportunamente en la posición 4' ó 5' para formar un conjugado de polipéptido-MPA (PP-MPA), véase Amerongen, A.V. y col., Peptide Research 5 (5), 269-274, 1992.

Se realiza el ensayo mezclando una muestra clínica con el PP-MPA, un anticuerpo o un reactivo apropiado de fijación elegido para el antígeno de interés, la IMPDH y los reactivos apropiados para el ensayo de la IMPDH. Si la muestra no contiene antígeno, el conjugado PP-MPA se unirá al anticuerpo y no quedará disponible para inhibir a la IMPDH. Si la muestra contiene el antígeno diana concreto, para el que se ha diseñado el ensayo, entonces el conjugado PP-MPA competirá con el antígeno para combinarse con el anticuerpo limitado presente. La cantidad de la inhibición de la IMPDH es proporcional a la cantidad de antígeno libre presente en la muestra. Puede generarse un ensayo cuantitativo representado la concentración de antígeno frente a la actividad de la IMPDH. La cantidad de antígeno presente será inversamente proporcional a la cantidad de la actividad de la IMPDH.

Una mejor comprensión de la presente invención se conseguirá con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Abreviaturas empleadas:

ACES	ácido N-[2-acetamido]-2-aminoetanosulfónico
DADDOO	1,8-diamino-3,6-dioxa-octano-2,2'-(etilenodioxi)-bis-etilamina
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
DMF	N,N-dimetilformamida
DMPU	1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
HMPA	hexametilfosforamida
MEM	2-metoxietoximetilo
NaHMDS	bis(trimetilsilil)amida sódica
NHS	N-hidroxisuccinimida
HPLC-RP	cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa
TAPSO	3-[N-tris-(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxi-propanosulfonato Na
TBAF	fluoruro de tetrabutylamonio
TBDPS	tert-butildifenilsililo
Tboc	tert-butoxicarbonilo
TCEP	tris(2-carboxietil)fosfina, clorhidrato
THF	tetrahidrofurano

En los ejemplos que siguen, los números en negrita indican la correspondiente estructura de las figuras.

Ejemplo 1

Obtención de reactivo anticuerpo para el ensayo del ácido micofenólico

Se prepara del modo siguiente un litro de un reactivo anticuerpo o primer reactivo.

Se introducen en un recipiente aproximadamente 800 ml de agua desionizada, se le añaden 6,0 gramos de ACES y se disuelven. Se ajusta el pH a 6,0 con NaOH 2N. Después se añaden 0,53 gramos de NAD y se disuelven por completo. A continuación se añaden 10 ml de anticuerpo monoclonal anti-MPA de ascitis. Después se añaden 0,95 gramos de azida sódica y se disuelven y finalmente se añade 1,0 gramo de SUTTOCIDE A (GAF Chemicals Corp.) y se disuelve. El volumen se ajusta a un litro con agua desionizada.

TABLA 1

Composición de reactivo anticuerpo

Reactivo anticuerpo, pH 6,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 µl
ACES	182,2	0,0330	6,0	tampón, estabilizador NAD	0,0163
NAD	663,4	0,0008	0,53	sustrato de enzima	0,0004
anti-MPA	-	-	1:100	anticuerpo monoclonal	-
azida Na	65,0	0,0146	0,95	conservante antimicrobiano	0,0072
SUTTOCIDE A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004

Se prepara el anticuerpo con arreglo al procedimiento descrito por Alexander y col. en la publicación de patente PCT WO 96/02004 (1996). Para la práctica de la presente invención puede utilizarse cualquier anticuerpo, ya sea monoclonal, ya sea policlonal, que tenga especificidad para el MPA. Sin embargo, en general son preferidos los anticuerpos monoclonales, porque su producción es más fácil y consistente.

Ejemplo 2

Obtención del reactivo enzima para el ensayo del ácido micofenólico

Del modo siguiente se prepara un litro del reactivo enzima o segundo reactivo.

En un recipiente se introducen aproximadamente 800 ml de agua desionizada, se les añaden 56,3 gramos de Na-TAPSO y se disuelven por completo. Después se añaden 81,6 gramos de acetato sódico-3H₂O y se disuelven. A continuación se añaden 1,15 gramos de TCEP y se disuelven. Después se añaden 0,319 gramos de IMP y se disuelven, después se añaden 2,23 gramos de Na₂EDTA y se disuelven. A continuación se añade 1,0 gramo de SUTTOCIDE A y se disuelve. Se ajusta el volumen a un litro con agua desionizada. Se añaden aproximadamente 13,4 ml de la IMPDH-II recombinante humana (lisado de *E. coli*) y se disuelven por completo con el fin de lograr un cambio de absorbancia a 340 nm de 4400×10^{-4} durante 5 minutos a 37°C. A continuación se añaden 0,002 gramos del conjugado ligando-inhibidor (MPA-MPA, ejemplo 42) y se disuelven.

El procedimiento empleado para la clonación y la purificación de la IMPDH-II se ha descrito en Carr, S.F. y col., *J. Biological Chemistry* 268 (36), 27286-27290, 1993, cuyo contenido se incorpora a la presente como referencia. La clonación de la IMPDH se ha descrito también en Collart, F.R. y col., patente US-5,665,583 (1997). La IMPDH de origen natural no es un producto comercial. Es también idónea cualquier fuente natural de IMPDH que se inhiba con el MPA o con un derivado de MPA.

ES 2 298 146 T3

La cantidad eficaz de componentes reactivos es variable en función de las necesidades específicas y puede ajustarse por simple experimentación en laboratorio para cumplir los requisitos concretos del ensayo.

Se elige la concentración de analito-MPA en base al grado de inhibición de la IMPDH causada por el analito-MPA con y sin anticuerpo específico del analito. Para uso en el ensayo se elige la diferencia máxima en cambio porcentual de inhibición con y sin anticuerpo. Se ha encontrado que, en general, una concentración de MPA ligeramente inferior a su valor IC_{50} y una concentración molar de analito-MPA producen la diferencia máxima en cambio porcentual de inhibición de la IMPDH. Con dos sitios de unión por anticuerpo, el número total de sitios de fijación de analito es ligeramente inferior a la concentración molar total de analito-MPA. La actividad de la enzima tiene un ligero efecto en los valores IC_{50} del analito-MPA. Cuanto menor es la actividad de la enzima, tanto menor es el valor IC_{50} del analito-MPA. Esto es consistente con Nowak, I. y col., *Therapeutic Drug Monitoring* 19, 358-360, 1997. Por consiguiente, la actividad de la IMPDH se ajusta para producir un valor IC_{50} mínimo para el analito-MPA.

TABLA 2

Composición de reactivo enzima

Reactivo enzima, pH 8,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 μ l
Na TAPSO	281,3	0,2	56,3	tampón	0,1
acetato Na-3H ₂ O	136,1	0,6	81,6	estabilizador enzimático: reduce la agregación de	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	enzima	0,002
Na ₂ IMP	392,2	0,0008	0,319	estabilizador enzimático: reduce grupos sulfhidrilo de la	0,0004
Na ₂ EDTA	372,2	0,006	2,23	cisteína	0,003
SUTTOCIDE A (50 %)	127,1	0,004	1,0	sustrato enzimático	0,004
IMPDH-II	-	-	-	estabilizador enzimático: secuestra metales pesados, mantiene reducidos los	-
MPA-MPA	581	$3,4 \times 10^{-6}$	0,002	sulfhidrilos de la cisteína	$1,7 \times 10^{-6}$
				conservante antimicrobiano	
				enzima	
				analito-MPA	

Ejemplo 3

Medición del ácido micofenólico

Se ensayan muestras de plasma humano con pequeñas adiciones de ácido micofenólico para determinar el contenido de MPA aplicando el método de la presente invención. Se programa un analizador HITACHI 717 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) para que dispense 3 μ l de muestra y 150 μ l de reactivo anticuerpo a una cubeta a 37°C, que seguidamente se mezclan y se incuban durante 5 minutos, pasado este tiempo se añaden 150 μ l del reactivo enzima y se mezclan. Se calcula la diferencia de absorbancia a 340 nm entre la adición inicial del reactivo enzima y 5 minutos después de la adición del reactivo enzima.

TABLA 3

Actividad de la IMPDH en función de la concentración del conjugado analito-MPA, anticuerpo y analito

3 μ l muestra (MPA μ g/ml)		150 μ l reactivo anticuerpo (+/-anti-MPA)	150 μ l reactivo enzima (+/-MPA-MPA)	$\Delta A \times 10^{-4}$ a 340 nm
A	0	-	-	4338
	5	-	-	1939
	10	-	-	541
B	0	-	+	1666
	5	-	+	557
	10	-	+	214
C	0	+(1:100)	+	3109
	5	+(1:100)	+	2671
	10	+(1:100)	+	2135
D	0	+(1:1000)	+	1957
	5	+(1:1000)	+	804
	10	+(1:1000)	+	304
E	0	+(1:100)	-	4330
	5	+(1:100)	-	4075
	10	+(1:100)	-	3667

En la tabla 3 se recoge la actividad de la IMPDH en función de la concentración del conjugado analito-MPA (MPA-MPA), del anticuerpo de MPA y del analito ácido micofenólico (MPA). Los datos indican que el conjugado analito-MPA posee características inhibitorias útiles, necesarias para el inmunoensayo homogéneo; es decir, el conjugado analito-MPA se fija tanto sobre la IMPDH y como sobre su anticuerpo específico y esta fijación es un acontecimiento mutuamente excluyente. En el conjunto de muestras A, los reactivos no contienen anticuerpo ni analito-MPA y producen una actividad máxima de la IMPDH. En el conjunto de muestras B, el reactivo enzima contiene analito-MPA y se utiliza para poner de manifiesto el efecto analito-MPA en la actividad de la IMPDH. El conjunto de muestras C se prepara para modular la actividad de la IMPDH con el MPA cuando están presentes tanto el anticuerpo como el analito-MPA. En el conjunto de muestras D no está presente anticuerpo suficiente en el reactivo anticuerpo para fijar al MPA o al conjugado MPA-MPA y pone de manifiesto que la concentración de anticuerpo es insuficiente. En el conjunto de muestras E está presente anticuerpo suficiente para fijar la mayor parte del MPA y pone de manifiesto el efecto de fijación del anticuerpo sobre el MPA solo. Compárense estos resultados con los obtenidos sin anticuerpo, que son los del conjunto de muestras A.

Ejemplo 4

Preparación del engarce bromo-isoprenilo, éster metílico del ácido MPA y 3- β -amino-digoxigenina

Se obtiene el engarce bromo-isoprenilo (1) con arreglo al procedimiento publicado por Stephanie E. Sen y Gregory J. Ewing en J. Org. Chem. 62, 3529-3536, 1997.

ES 2 298 146 T3

Se obtiene el éster metílico del MPA (2) con arreglo al procedimiento publicado por William A. Lee, Leo Gu, Andrew R. Miksztal, Nancy Chu, Kwan Leung y Peter H. Nelson en *Pharmaceutical Research* **7**, 161-166, 1990.

Se obtiene la 3- β -amino-digoxigenina con arreglo al procedimiento publicado en *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**, 771-774, 1999.

Se obtiene la teofilina-amina (17) con arreglo al procedimiento publicado en solicitud de patente PCT WO 87/07955 (1987).

Ejemplo 5

Obtención del éster metílico del ácido 5'-isoprenil-[OTBDPS]-MPA (3)

En atmósfera de argón se enfría con un baño de acetona/hielo seco una solución de 4,02 ml (4,01 mmoles) de bis(trimetilsilil)amida sódica, solución 1M en tetrahidrofurano (THF). A esta mezcla reaccionante se le añade por goteo a solución de 600 mg (1,79 mmoles) de éster metílico del MPA (2) en 7 ml de THF anhidro. Se mantiene en agitación la solución resultante a -78°C durante 30 minutos y se le añade una solución de 84 mg (0,46 mmoles) de hexametilfosforamida (HMPA) en 2 ml de THF. Se mantiene la mezcla reaccionante en agitación durante 15 minutos a -78°C y se le añade por goteo una solución de 840 mg (2,08 mmoles) del engarce bromoisoprenilo (1) en 2 ml de THF. Se retira el baño de hielo seco y se deja calentar lentamente la mezcla reaccionante a temperatura ambiente durante un período de 20 minutos. Se interrumpe la reacción con 5 ml de una solución saturada de cloruro amónico. A la mezcla reaccionante se le añaden 100 ml de agua y se extrae con 200 ml de acetato de etilo. Se separa la fase orgánica y se extrae de nuevo la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 100 ml). Se reúnen las fases orgánicas, se lavan con 100 ml de salmuera, se secan (Na₂SO₄) y se concentran. Se purifica el producto en bruto por cromatografía de columna a través de gel de sílice empleando acetato de etilo al 20% en hexano, de este modo se obtienen 501 mg (43%, 0,76 mmoles) del éster metílico del ácido 5'-isoprenil-[OTBDPS]-MPA (3).

Ejemplo 6

Obtención del éster metílico del ácido 5'-isoprenil-[OTBDPS]-MPA [OMEM] (4)

Se enfría en un baño de hielo una solución de 240 mg (0,36 mmoles) del compuesto 3 en 5 ml de diclorometano seco. A la mezcla reaccionante se le añaden 76 μ l (0,433 mmoles) de N,N-diisopropiletilamina y después 42 μ l (0,36 mmoles) de cloruro de 2-metoxietoximetilo. Se mantiene la mezcla en agitación en un baño de hielo durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 18 horas. Se diluye la mezcla con 15 ml de diclorometano. Se lava la fase orgánica con 3 x 20 ml de agua, se seca (Na₂SO₄) y se concentra. Se purifica el producto en bruto por cromatografía de columna a través de gel de sílice empleando hexano al 60% en acetato de etilo, obteniéndose 175 mg (0,23 mmoles, 64%) del compuesto 4.

Ejemplo 7

Obtención del éster metílico del ácido 5'-isoprenil-[OH]-MPA [OMEM] (5)

Se enfría a 0°C una solución de 1,09 g (1,46 mmoles) del compuesto 4 en 40 ml de THF. A esta solución enfriada se le añaden en atmósfera de argón 4,37 ml (4,35 mmoles) de fluoruro de tetrabutilamonio (solución 1M en THF). Se mantiene la mezcla reaccionante en agitación a 0°C durante 1,5 horas y 1 hora a temperatura ambiente. Se interrumpe la reacción con 5 ml de agua y se concentra. Se diluye la mezcla reaccionante con 75 ml de diclorometano y se lava con 3 x 75 ml de agua, se seca (Na₂SO₄) y se concentra. Se purifica el producto en bruto por cromatografía de columna a través de gel de sílice empleando acetato de etilo al 80% en hexano, obteniéndose 408 mg (0,806 mmoles, 55%) del compuesto 5.

Ejemplo 8

Obtención del L-tiroxina[N-t-Boc] (6)

A una mezcla agitada con agitador magnético de 4,5 g (5,8 mmoles) de L-tiroxina, 18 ml de DMF, 5,85 ml de NaOH 1N, 495 mg de NaHCO₃ y 18 ml de agua, que forma una suspensión, se le añaden 1,28 g (5,8 mmoles) de dicarbonato de di-t-butilo en 18 ml de dimetilformamida. Se mantiene en agitación la mezcla reaccionante resultante durante 4 horas y después se concentra a presión reducida y a temperatura ambiente. Al residuo se le añaden 45 ml de metanol y se separa por filtración el material insoluble. Al líquido filtrado se le añade HCl 1N (20 ml) hasta que haya finalizado la precipitación. Se filtra el sólido y se seca con aire, obteniéndose 4,2 g (4,78 mmoles, 82%) de L-tiroxina-(N-t-Boc) (6).

Ejemplo 9

Obtención de la L-tiroxina-(N-t-Boc)-amidoetilenoamina (7)

A 500 mg (0,57 mmoles) de L-tiroxina-(N-t-Boc) (6) se les añaden 15 ml de DMF anhidra y después 149 mg (1,29 mmoles) de N-hidroxisuccinimida y 283 mg (1,47 mmoles) de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida. Se mantiene la mezcla en agitación a temperatura ambiente 3 horas. Se utiliza este éster activado “*in situ*” para el paso siguiente. A 5,5 ml de piridina anhidra se les añaden 1,5 ml (22 mmoles) de etilenodiamina. Se mantiene la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añade por goteo a esta solución la solución preparada anteriormente del éster activado de la tiroxina. Se mantiene la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante un período de 48 horas. Se concentra la mezcla reaccionante y se le añaden 100 ml de una solución saturada de Na₂CO₃. Se separa el sólido por filtración y se lava con 100 ml de agua. Se purifica este sólido en bruto por cromatografía de columna empleando cloroformo al 50% en metanol, obteniéndose 250 mg (0,27 mmoles, 48%) del compuesto 7.

Ejemplo 10

Preparación del conjugado del éster metílico del ácido 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenoamido)-tiroxina-(N-t-Boc)]-MPA [OMEM] (8)

A 25 mg (0,049 mmoles) del compuesto (5) se le añade 1 ml de THF y después 12,6 mg (0,046 mmoles) del carbonato de N,N'-disuccinimidilo y 20 µl de trietilamina. Se mantiene la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas, obteniéndose el correspondiente carbonato de N-hidroxisuccinimidilo.

Se disuelve la L-tiroxina-[N-t-Boc]-amidoetilenoamina (7,22 mg, 0,023 mmoles) en 1 ml de DMF anhidra y se le añaden 100 µl de trietilamina. A esta solución se le añade por goteo la solución preparada previamente del carbonato de MPA-N-hidroxisuccinimidilo (generada “*in situ*”). Se mantiene la mezcla reaccionante en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y se concentra en el evaporador rotatorio. Se purifica el residuo por HPLC preparativa en fase inversa (columna Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) empleando un sistema de gradiente de agua/acetonitrilo que contiene un 0,1% ácido trifluoracético. Se reúnen las fracciones que contienen producto, se evapora el acetonitrilo y se liofiliza la mezcla restante, obteniéndose 24 mg (0,016 mmoles, 34%) del compuesto 8.

Ejemplo 11

Obtención del conjugado 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenoamido)-tiroxina-(N-t-Boc)]-MPA [OMEM] (9)

A 22 mg (0,015 mmoles) del éster metílico del ácido 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenoamido)-tiroxina-(N-t-Boc)]-MPA [OMEM] (8) se le añaden 2 ml de metanol y a solución de 40 mg (1,6 mmoles) de hidróxido de litio en 1 ml de agua. Se mantiene la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 2 días y se concentra en el evaporador rotatorio. A la mezcla reaccionante se le añaden 2 ml de agua y se ajusta el pH a 6 con ácido fosfórico diluido. Se concentra la mezcla reaccionante a sequedad y se le añaden 100 ml de metanol. Se filtra la mezcla y se concentra el líquido filtrado. Se purifica el residuo por HPLC preparativa en fase inversa (columna Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) empleando un sistema de gradiente de agua/acetonitrilo que contiene un 0,1% de ácido trifluoracético. Se reúnen las fracciones que contienen producto, se evapora el acetonitrilo y se liofiliza la mezcla restante, obteniéndose 11 mg (0,007 mmoles, 52%) del compuesto 9.

Ejemplo 12

Obtención del conjugado 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenoamido)-tiroxina]-MPA (11)

A 5 mg (0,003 mmoles) del conjugado éster metílico del ácido 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetilenoamido)-tiroxina-(N-t-Boc)]-MPA [OMEM] (9) se le añaden 1,5 ml de diclorometano y se enfría la solución a 0°C. A esta solución se le añade en dos porciones una solución enfriada con hielo de 200 µl de ácido trifluoracético al 50% en diclorometano en un intervalo de 5 minutos. Se mantiene la mezcla en agitación en un baño de hielo durante 15 minutos más. Se concentra esta a presión reducida. Se hace el seguimiento de la formación de producto por HPLC-RP analítica (columna C-18, Vydac 4,6 mm x 250 mm) empleando un sistema de gradiente de agua/acetonitrilo que contienen un 0,1% de ácido trifluoracético. Se somete de nuevo la mezcla reaccionante a un tratamiento con ácido trifluoracético. Se disuelve de nuevo la mezcla reaccionante en bruto en 1,5 ml de diclorometano y se enfría la solución a 0°C. A esta solución se le añade una solución enfriada con hielo de 200 µl de ácido trifluoracético al 50% en diclorometano en dos porciones, en un intervalo de 5 minutos. Se mantiene la mezcla en agitación a 0°C durante 25 minutos. Se concentra la mezcla reaccionante en el evaporador rotatorio y después con una bomba de alto vacío. Se hace el seguimiento de la formación de producto por HPLC-RP analítica (C-18, Vydac 4,6 mm x 250 mm) empleando un sistema de gradiente de agua/acetonitrilo que contiene un 0,1% de ácido trifluoracético. Los resultados indican que la mezcla reaccionante es una mezcla de conjugados que contiene principalmente el 5'-[(isopreniloxicarbonilaminoetileno-amido)-tiroxina-(N-t-Boc)]-MPA (10) desprotegido de MEM con alguna cantidad del producto deseado (11).

ES 2 298 146 T3

Se somete de nuevo el producto anterior a un tratamiento con ácido trifluoracético. Se trata la mezcla reaccionante anterior con 2 ml de diclorometano y se enfría en un baño de hielo. A esta mezcla se le añade una solución enfriada con hielo de 600 μ l de ácido trifluoracético al 50% en diclorometano en tres porciones, a intervalos de 5 minutos. Se mantiene la mezcla en agitación en el baño de hielo durante 25 minutos más. Se concentra la mezcla a presión reducida. Se purifica el producto en bruto por HPLC semi-preparativa en fase inversa (C-18, Vydac, 10 mm x 250 mm) empleando un sistema de gradiente de agua/acetonitrilo que contiene un 0,1% ácido trifluoracético (3 ml/min). Se reúnen las fracciones que contienen producto, se evapora el acetonitrilo y se liofiliza la mezcla restante, obteniéndose 1,8 mg (0,0013 mmoles, 45%) del compuesto 11.

Ejemplo 13

Obtención del éster t-butilico del ácido MPA (12)

Se disuelve el ácido micofenólico (860 mg, 2,68 mmoles) en una solución de 1,4-dioxano que contiene 700 μ l de H_2SO_4 conc. Se trasvasa esta solución a un frasco de presión y se enfría este con hielo. Se vierte el isobutileno (20 ml) sobre la solución del ácido micofenólico. Se cierra el frasco de presión y se agita muy lentamente con una varilla magnética a temperatura ambiente durante 2 días. Se enfría la mezcla con acetona/hielo seco y se expande lentamente la presión. Se deja calentar la mezcla a temperatura ambiente y se diluye con 150 ml de acetato de etilo. Se separa la fase acuosa y se extrae con 3 x 100 ml de acetato de etilo. Se reúnen las fases orgánicas, se lavan con 100 ml de agua, 100 ml de una solución saturada de $NaHCO_3$ y después con 100 ml de agua, se secan (Na_2SO_4) y se concentran. Se purifica el producto en bruto por cromatografía de columna a través de gel de sílice empleando hexano al 80% en acetato de etilo, obteniéndose 590 mg (1,63 mmoles, 60%) del éster t-butilico del MPA (12).

Ejemplo 14

Obtención del éster t-butilico del ácido 5'-etoxicarbonilmetil-MPA (13)

En atmósfera de argón se enfría a $-78^\circ C$ en un baño de acetona/hielo seco una solución de 3,2 ml (3,19 mmoles) de la bis(trimetilsilil)amida sódica (solución 1,0M en THF). A esta solución enfriada se le añaden 0,32 ml (2,64 mmoles) de DMPU y se mantiene en agitación a $-78^\circ C$ durante 15 minutos. A la mezcla reaccionante se le añade por goteo una solución de 398 mg (1,10 mmoles) del éster t-butilico del ácido MPA (12) en 5 ml de THF recién destilado. Se mantiene la mezcla reaccionante en agitación a $-78^\circ C$ durante 30 minutos y se le añaden 0,18 ml (1,61 mmoles) de bromo-acetato de etilo. Se agita la mezcla resultante a $-40^\circ C$ durante 3 horas y a $0^\circ C$ durante 1 hora. Se interrumpe la reacción con 10 ml de una solución saturada de cloruro amónico y se deja calentar la mezcla a temperatura ambiente. Se añaden otros 80 ml de una solución saturada de cloruro amónico y se extrae la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 80 ml). Se reúnen las fases orgánicas, se secan (Na_2SO_4) y se concentran. Se purifica el producto en bruto por cromatografía a través de gel de sílice, eluyendo en primer lugar con hexano al 80% en acetato de etilo y después con acetato de etilo al 50% en hexano, obteniéndose 330 mg de un producto que contiene impurezas. Se purifica de nuevo este por HPLC preparativa en fase inversa (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) empleando un sistema de gradiente de agua/acetonitrilo que contiene un 0,1% de ácido trifluoracético. Se reúnen las fracciones que contienen producto, se evapora el acetonitrilo y se liofiliza la mezcla restante, obteniéndose 163 mg (0,35 mmoles, 32%) del compuesto 13.

Ejemplo 15

Obtención del éster t-butilico del ácido 5'-carboximetil-MPA (14)

Se prepara una solución de 141 mg (0,30 mmoles) del compuesto 13 en 41,1 ml de DMSO. Se diluye esta solución con 81 ml de un tampón fosfato potásico 0,1M, de pH 7,0, y se le añaden 306 μ l de esterasa (de hígado de cerdo, Roche Diagnostics, suspensión de 10 mg/ml). Se mantiene la mezcla reaccionante en agitación a temperatura ambiente durante 3 días y se filtra. Se purifica el líquido filtrado por HPLC preparativa en fase inversa (WATERS DELTAPAK C-18 50 x 250 mm, sistema agua/acetonitrilo que contiene un 0,1% de ácido trifluoracético). Se reúnen las fracciones que contienen producto, se evapora el acetonitrilo y se liofiliza la mezcla, obteniéndose 76 mg (0,17 mmoles, 57%) del éster t-butilico del ácido 5'-carboximetil-MPA (14).

Ejemplo 16

Obtención del conjugado de éster t-butilico del ácido 5'-(digoxigenin-3-il- β -amidometil)-MPA (15)

Se disuelve el éster t-butilico del ácido 5'-carboximetil-MPA (20 mg, 46 μ moles) en 193 μ l de DMF. A esta mezcla reaccionante se le añaden 7,95 mg (69 μ moles) de N-hidroxisuccinimida y 11,4 mg (55,2 μ moles) de DCC. Se mantiene la mezcla reaccionante en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añaden otros 2,65 mg (23 μ moles) de N-hidroxisuccinimida y 2,85 mg (13,8 μ moles) de DCC disueltos en 55 μ l de DMF y se mantiene la mezcla reaccionante en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se le añade una solución de 23,2 mg (46 μ moles) de 3- β -amino-digoxigenina en 63,8 μ l (460 μ moles) de trietilamina y 120 μ l de DMF. Se mantiene la mezcla

ES 2 298 146 T3

reaccionante en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y se concentra, obteniéndose 68 mg del producto en bruto (15). Este se emplea en el paso siguiente sin más purificación.

5 Ejemplo 17

Obtención del conjugado 5'-(digoxigenin-3-il-β-amidometil)-MPA (16)

10 Se disuelve el producto en bruto del éster t-butilico del 5'-(digoxigenin-3-il-β-amidometil)-MPA (15) en 3 ml de diclorometano. A la mezcla reaccionante se le añaden 3 ml de ácido trifluoracético y se mantiene la solución en agitación a temperatura ambiente durante exactamente 30 minutos. Se concentra la solución y se purifica el residuo inmediatamente del modo siguiente: se disuelve el residuo en 1,5 ml de metanol y se purifica inmediatamente empleando una HPLC semi-preparativa en fase inversa (Vydac C-18 300 A 10µm 22 x 250 mm, sistema de agua/acetonitrilo que contiene un 0,1% de ácido trifluoracético), obteniéndose 7,3 mg del isómero A (16A) y 7,4 mg del isómero B (16B).

15 TABLA 4

Características de los isómeros

20		isómero A	isómero B
25	HPLC-RP (Vydac C-18 5 µm, 300 Å, 4,6 x 250 mm; gradiente: acetonitrilo del 0 al 100 % + 0,1 % de TFA en 50 minutos)	93 % (UV 226 nm) Rt = 25,09 min	87 % (UV 226 nm) Rt = 25,34 min
30	EM RMN-H ¹	OK compatible	OK compatible

35 Ejemplo 18

Obtención del reactivo anticuerpo para el ensayo de tiroxina

Se prepara del modo siguiente un litro de reactivo anticuerpo o primer reactivo.

40 Se introducen en un recipiente aproximadamente 800 ml de agua desionizada, se les añaden 6,0 gramos del ácido N-[2-acetamido]-2-aminoetanosulfónico (ACES) y se disuelven. Se ajusta el pH a 6,0 con NaOH 2N. Después se añaden 0,663 gramos de NAD y se disuelven por completo. A continuación se añaden 0,95 gramos de azida sódica y se disuelven, y finalmente se añade 1,0 gramo de SUTTOCIDE A y se disuelve. El volumen se ajusta a un litro con agua desionizada. Finalmente se añaden 10 miligramos de anticuerpo monoclonal anti-L-tiroxina.

45 TABLA 5

Composición de reactivo anticuerpo

50	Reactivo anticuerpo, pH 6,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 µl
55	ACES	182,2	0,0330	6,0	tampón, estabilizador NAD	0,0163
60	NAD	663,4	0,001	0,6634	sustrato de enzima	0,0005
	anti-L-tiroxina	150.000	-	0,010	anticuerpo monoclonal	-
	azida Na	65,0	0,0146	0,95	conservante antimicrobiano	0,0072
65	Suttocide A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004

ES 2 298 146 T3

Se prepara el anticuerpo con arreglo a procedimientos fácilmente disponible y que los expertos en la materia ya conocen, si son del ámbito de la presente invención. En la práctica de la presente invención se puede utilizar cualquier anticuerpo, ya sea monoclonal, ya sea policlonal, que tenga especificidad para la tiroxina. Sin embargo, en general son preferidos los anticuerpos monoclonales, porque su producción es más fácil y consistente.

Ejemplo 19

Obtención del reactivo enzima para el ensayo de la tiroxina

Se prepara del modo siguiente un litro del reactivo enzima o segundo reactivo. En un recipiente se introducen aproximadamente 800 ml de agua desionizada y se les añaden 168,8 gramos de NaTAPSO y se disuelven por completo. A continuación se disuelven 1,15 gramos de TCEP. Después se disuelven 31,4 gramos de IMP y a continuación se disuelven 2,23 gramos de Na₂EDTA. Después se disuelve 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajusta a un litro con agua desionizada. Se añade IMPDH-II recombinante humana en cantidad suficiente (en forma de un precipitado de sulfato amónico al 35% de un líquido sobrenadante de lisado de *E. coli*) y se disuelve por completo con el fin de lograr un cambio de absorbancia a 340 nm de 780×10^{-4} en un período de 5 minutos a 37°C. A continuación se añaden 0,0005 gramos del conjugado de 5'-[(isopreniloxycarbonilamino-etilenoamido)-tiroxina]-MPA (11) y se disuelven.

TABLA 6

Composición de reactivo enzima

Reactivo enzima, pH 8,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 µl
Na TAPSO	281,3	0,6	168,8	tampón, estabilizador enzimático: reduce la agregación de enzima	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	estabilizador enzimático: reduce grupos sulfhidrido de la cisteína	0,002
Na ₂ IMP	392,2	0,08	31,4	sustrato enzimático, estabilizador de enzimas	0,04
Na ₂ EDTA	372,2	0,006	2,23	estabilizador enzimático: secuestra metales pesados, mantiene reducidos los sulfhidrilos de la cisteína	0,003
SUTTOCIDE A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	enzima	-
5'-[(isoprenil-oxycarbonilamino-etilenoamido)-tiroxina]-MPA	1363,44	$3,7 \times 10^{-7}$	0,0005	analito-MPA	$1,8 \times 10^{-7}$

Ejemplo 20

Medición de la tiroxina

- 5 Se ensayan muestras salinas con pequeñas concentraciones de L-tiroxina para determinar el contenido de tiroxina aplicando el método de la presente invención. Se preparan las muestras suspendiendo la L-tirosina (Sigma Chemical) en la soluciones salinas, disolviéndola por adición de goteo de NaOH 1N y después diluyendo la solución salina para conseguir concentraciones finales de 100, 250, 500 y 1000 ng/ml.
- 10 Se programa un analizador HITACHI 917 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) para que dispense 3 μ l de muestra y 150 μ l de reactivo anticuerpo en una cubeta a 37°C, que después se mezclan y se incuban durante 5 minutos, pasado este tiempo se añaden 150 μ l de reactivo enzima y se mezclan. Se calcula la diferencia de absorbancia a 340 nm (mA/min) durante un período de 3 minutos 13 segundos a 4 minutos 42 segundos (marco de lectura: 29-34) después de la adición del reactivo enzima. Los resultados obtenidos se representan en la figura 2.

Ejemplo 21

Obtención del reactivo anticuerpo para el ensayo de la digoxigenina

- 20 Se prepara del modo siguiente un litro de reactivo anticuerpo o primer reactivo. Se introducen en un recipiente aproximadamente 800 ml de agua desionizada, se le añaden 6,0 gramos de ACES y se disuelven. Se ajusta el pH a 6,0 con NaOH 2N. Después se añaden 0,53 gramos de NAD y se disuelven por completo. Después se añaden 0,95 gramos de azida sódica y se disuelven y finalmente se añade 1,0 gramo de SUTTOCID A y se disuelve. El volumen se ajusta a un litro con agua desionizada. Finalmente se añaden 25 miligramos del anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina.

TABLA 7

Composición de reactivo anticuerpo

Reactivo anticuerpo, pH 6,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 μ l
ACES	182,2	0,0330	6,0	tampón, estabilizador NAD	0,0163
NAD	663,4	0,0008	0,53	sustrato de enzima	0,0004
anti-digoxigenina	150.000	-	0,025	anticuerpo monoclonal	-
azida Na	65,0	0,0146	0,95	conservante antimicrobiano	0,0072
SUTTOCID A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004

- 55 El anticuerpo empleado es un producto comercial (Roche, n° de catálogo = 1333062). Sin embargo, para la práctica de la presente invención puede utilizarse cualquier anticuerpo, ya sea monoclonal, ya sea policlonal, que tenga especificidad para la digoxigenina. Sin embargo, en general son preferidos los anticuerpos monoclonales, porque su producción es más fácil y consistente.

Ejemplo 22

Obtención del reactivo enzima para el ensayo de la digoxigenina

- 65 Se prepara del modo siguiente un litro del reactivo enzima o segundo reactivo. En un recipiente se introducen aproximadamente 800 ml de agua desionizada y se les añaden 56,3 gramos de NaTAPSO y se disuelven por completo. Después se añaden 81,6 gramos de acetato Na-3H₂O y se disuelven. A continuación se disuelven 1,15 gramos de

ES 2 298 146 T3

TCEP. Después se disuelven 0,319 gramos de IMP y a continuación se disuelven 2,23 gramos de Na₂EDTA. Después se disuelve 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajusta a un litro con agua desionizada. Se añade IMPDH-II recombinante humana en cantidad suficiente (en forma de un precipitado de sulfato amónico al 35% de un líquido sobrenadante de lisado de *E. coli*) y se disuelve por completo con el fin de lograr un cambio de absorbancia a 340 nm de 1280×10^{-4} en un período de 5 minutos a 37°C. A continuación se añaden 0,0001 gramos de (4'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA o 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA) y se disuelven.

TABLA 8

Composición de reactivo enzima

Reactivo enzima, pH 8,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 µl
Na TAPSO	281,3	0,2	56,3	tampón,	0,1
acetato Na-3H ₂ O	136,1	0,6	81,6	estabilizador enzimático: reduce la agregación de enzima	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	estabilizador enzimático: reduce grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,002
Na ₂ IMP	392,2	0,0008	0,319	sustrato enzimático	0,0004
Na ₂ EDTA	372,2	0,006	2,23	estabilizador enzimático: sequestra metales pesados, mantiene reducidos los sulfhidrilos de la cisteína	0,003
SUTTOCIDE A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	enzima	-
4'-[(digoxigenin-3-il)-oxi-metil-carbonil-DA-DOO-carbonil-metil]-MPA	939,12	$1,07 \times 10^{-6}$	0,001	analito-MPA	$5,3 \times 10^{-7}$
5'-[(digoxigenin-3-il)-oxi-metil-carbonil-DA-DOO-carbonil-metil]-MPA	939,12	$1,07 \times 10^{-6}$	0,001	analito-MPA	$5,3 \times 10^{-7}$

Ejemplo 23

Medición de la digoxigenina

Se ensayan muestras salinas con pequeñas concentraciones de digoxigenina para determinar el contenido de digoxigenina aplicando el método de la presente invención. En primer lugar se disuelve la digoxigenina (Sigma Chemical) en DMSO del 100% y después se añade sobre plasma humano normal para conseguir concentraciones de 0,5, 1,0, 5,0 y 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Se programa un analizador HITACHI 717 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) para que dispense 20 μl de muestra y 150 μl de reactivo anticuerpo a una cubeta a 37°C, que después se mezclan y se incuban durante 5 minutos, pasado este tiempo se añaden 150 μl de reactivo enzima y se mezclan. Se calcula la diferencia de absorbancia a 340 nm entre la adición inicial del reactivo enzima y 5 minutos después de la adición del reactivo enzima. Los resultados obtenidos se representan en la figura 3.

Con este ejemplo se demuestra que los conjugados obtenidos ya sea en la posición 4', ya sea en la posición 5' pueden utilizarse en la presente invención.

Ejemplo 24

Obtención del reactivo anticuerpo para el ensayo de la digoxigenina

Se prepara del modo siguiente un litro de reactivo anticuerpo o primer reactivo. Se introducen en un recipiente aproximadamente 800 ml de agua desionizada, se le añaden 6,0 gramos de ACES y se disuelven. Se ajusta el pH a 6,0 con NaOH 2N. Después se añaden 0,663 gramos de NAD y se disuelven por completo. Después se añaden 0,95 gramos de azida sódica y se disuelven y finalmente se añade 1,0 gramo de SUTTOCIDE A y se disuelve. El volumen se ajusta a un litro con agua desionizada. Finalmente se añaden 10 ó 15 miligramos del anticuerpo monoclonal anti-digitoxina.

TABLA 9

Composición de reactivo anticuerpo

Reactivo anticuerpo, pH 6,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 μl
ACES	182,2	0,0330	6,0	tampón, estabilizador NAD	0,0163
NAD	663,4	0,001	0,6634	sustrato de enzima	0,0005
anti-digitoxina	150.000	-	0,010 ó 0,015	anticuerpo monoclonal	-
azida Na	65,0	0,0146	0,95	conservante antimicrobiano	0,0072
SUTTOCIDE A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004

Se emplea menos anticuerpo monoclonal con el isómero B de la digoxigenina porque se observa una mejor sensibilidad de ensayo con este analito que con el anticuerpo monoclonal. Esto puede ser debido a una mayor competencia entre la fijación de la IMPDH y a fijación del anticuerpo monoclonal con este analito.

Ejemplo 25

Obtención del reactivo enzima para el ensayo de la digoxigenina

Se prepara del modo siguiente un litro del reactivo enzima o segundo reactivo. En un recipiente se introducen aproximadamente 800 ml de agua desionizada y se les añaden 168,8 gramos de NaTAPSO y se disuelven por completo. A continuación se disuelven 1,15 gramos de TCEP. Después se disuelven 31,4 gramos de IMP y a continuación se disuelven 2,23 gramos de Na₂EDTA. Después se disuelve 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajusta a

ES 2 298 146 T3

un litro con agua desionizada. Se añade IMPDH-II recombinante humana en cantidad suficiente (en forma de un precipitado de sulfato amónico al 35% de un líquido sobrenadante de lisado de *E. coli*) y se disuelve por completo con el fin de lograr un cambio de absorbancia a 340 nm de 3300×10^{-4} en un período de 5 minutos a 37°C. A continuación se añaden 0,0002 gramos de 5'-[(digoxigenin-3-il)-β-amidometil]-MPA (isómero A) o de 5'-[(digoxigenin-3-il)-β-amidometil]-MPA (isómero B) y se disuelven. O, como alternativa, se añaden 0,0005 gramos de 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (racémico) y se disuelven.

TABLA 10

Composición de reactivo enzima

Reactivo enzima, pH 8,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 µl
Na TAPSO	281,3	0,6	168,8	tampón, estabilizador enzimático: reduce la agregación de enzima	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	estabilizador enzimático: reduce grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,002
Na ₂ IMP	392,2	0,08	31,4	sustrato enzimático, estabilizador de enzima	0,04
Na ₂ EDTA	372,2	0,006	2,23	estabilizador enzimático: secuestra metales pesados, mantiene reducidos los sulfhidrilos de la cisteína	0,003
SUTTOCIDE A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	enzima	-
5'-[(digoxigenin-3-il)-β-amidometil]-MPA (isómero A)	749,91	$2,7 \times 10^{-7}$	0,0002	analito-MPA	$1,3 \times 10^{-7}$
5'-[(digoxigenin-3-il)-β-amidometil]-MPA (isómero B)	749,91	$2,7 \times 10^{-7}$	0,0002	analito-MPA	$1,3 \times 10^{-7}$
5'-[digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (racémico)	939,12	$5,3 \times 10^{-7}$	0,0005	analito-MPA	$2,7 \times 10^{-7}$

Ejemplo 26

Medición de la digoxigenina

Se ensayan muestras salinas con pequeñas concentraciones de digoxigenina para determinar el contenido de digoxigenina aplicando el método de la presente invención. En primer lugar se disuelve la digoxigenina (Sigma Chemical) en DMSO del 100% y después se añade sobre la solución salina para conseguir concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Se programa un analizador HITACHI 917 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) para que dispense 3 μl de muestra y 150 μl de reactivo anticuerpo a una cubeta a 37°C, que después se mezclan y se incuban durante 5 minutos, pasado este tiempo se añaden 150 μl de reactivo enzima y se mezclan. Se calcula la diferencia de absorbancia a 340 nm entre la adición inicial del reactivo enzima y 4 minutos 42 segundos después de la adición del reactivo enzima. Los resultados obtenidos se representan en la figura 4.

En este ejemplo se ilustra el uso de diferentes longitudes de engarces del conjugado analito-MPA.

Ejemplo 27

Obtención del primer reactivo para el ensayo de la teofilina

Se prepara del modo siguiente un litro de primer reactivo. Se introducen en un recipiente aproximadamente 800 ml de agua desionizada, se le añaden 6,0 gramos de ACES y se disuelven. Se ajusta el pH a 6,0 con NaOH 2N. Después se añaden 0,66 gramos de NAD y se disuelven por completo. Después se añaden 0,95 gramos de azida sódica y se disuelven y finalmente se añade 1,0 gramo de SUTTOCIDE A y se disuelve. El volumen se ajusta a un litro con agua desionizada.

TABLA 11

Composición del primer reactivo

Primer reactivo, pH 6,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 μl
ACES	182,2	0,0330	6,0	tampón, estabilizador NAD	0,0163
NAD	663,4	0,0010	0,66	sustrato de enzima	0,0005
azida Na	65,0	0,0146	0,95	conservante antimicrobiano	0,0072
SUTTOCIDE A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004

Ejemplo 28

Obtención del segundo reactivo para el ensayo de la teofilina

Se prepara del modo siguiente un litro del segundo reactivo. En un recipiente se introducen aproximadamente 800 ml de agua desionizada y se le añaden 168,8 gramos de NaTAPSO y se disuelven por completo. A continuación se disuelven 1,15 gramos de TCEP. Después se disuelven 31,4 gramos de IMP y a continuación se disuelven 2,23 gramos de Na_2EDTA . Después se disuelve 1,0 gramo de SUTTOCIDE A. El volumen se ajusta a un litro con agua desionizada. Se añade IMPDH-II recombinante humana en cantidad suficiente (en forma de un precipitado de sulfato amónico al 35% de un líquido sobrenadante de lisado de *E. coli*) y se disuelve por completo con el fin de lograr un cambio de absorbancia a 340 nm de 3100×10^{-4} en un período de 5 minutos a 37°C. A continuación se añaden 0,00027 gramos de 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarbonilo)isoprenil]-MPA (20) y se disuelven. Finalmente se añaden 10 ó 25 miligramos del anticuerpo monoclonal anti-teofilina.

ES 2 298 146 T3

TABLA 12

Composición del segundo reactivo

segundo reactivo, pH 8,0 componente	peso molec.	M	g/l	función	M final 150 μ l
Na TAPSO	281,3	0,6	168,8	tampón, estabilizador enzimático: reduce la agregación de enzima	0,3
TCEP	286,65	0,004	1,15	estabilizador enzimático: reduce grupos sulfhidrilo de la cisteína	0,002
Na ₂ IMP	392,2	0,08	31,4	sustrato enzimático, estabilizador de enzima	31,4
Na ₂ EDTA	372,2	0,006	2,23	estabilizador enzimático: secuestra metales pesados, mantiene reducidos los sulfhidrilos de la cisteína	0,003
SUTTOCIDE A (50 %)	127,1	0,004	1,0	conservante antimicrobiano	0,004
IMPDH-II	-	-	-	enzima	-
anti-teofilina	150.000	-	0,010-0,025	anticuerpo monoclonal	-
5'-[(teofilina-8-butiramidoetil-aminocarbonil-oxi)isoprenil]-MPA	738,78	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-4}$	analito-MPA	$1,8 \times 10^{-7}$

Se obtiene el compuesto por procedimientos ya conocidos de la técnica. En esta invención puede utilizarse cualquier anticuerpo monoclonal o policlinal específico de teofilina. Son preferidos los monoclonales por su facilidad y consistencia de producción.

Ejemplo 29

Medición de la teofilina

Se ensayan muestras salinas con pequeñas concentraciones de teofilina aplicando el método de la presente invención. En primer lugar se disuelve la teofilina (Sigma Chemical) en solución salina (1 mg/10 ml) y después se diluye para conseguir concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 50 μ g/ml. Se programa un analizador HITACHI 717 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis) para que dispense 3 μ l de muestra y 150 μ l del primer reactivo a una cubeta a 37°C, se mezclan y se incuban durante 5 minutos, se añaden 150 μ l de reactivo enzima y se mezclan. Se calcula la diferencia de absorbancia a 340 nm entre la adición inicial del reactivo enzima y 5 minutos después de la adición del reactivo enzima. Los resultados obtenidos se representan en la figura 5.

En este ejemplo se combinan analito-MPA y anticuerpo juntos en un mismo reactivo. El anticuerpo concreto de la teofilina empleado en este ensayo tiene una afinidad relativamente baja para la teofilina, de modo que el anticuerpo y el analito-MPA se combinan en primer lugar, antes de añadir la muestra, para formar antes un conjugado de analito-MPA-anticuerpo. Después se añade la muestra con la teofilina, la teofilina desplaza al conjugado analito-MPA, porque el anticuerpo tiene una afinidad más elevada para la teofilina, así el analito-MPA queda libre para inhibir la enzima.

Ejemplo 30

Constantes de inhibición de ligandos-inhibidores

5 La IC_{50} , constante de inhibidor, es la concentración molar del inhibidor que produce una inhibición del 50% de la actividad enzimática. Se emplea este ejemplo para ilustrar la potencia de inhibición enzimática de varios derivados de MPA.

10 Este ensayo mide la formación de la NADH durante la conversión del IMP en el XMP por acción de la IMPDH-II. El seguimiento de la reacción se realiza con un espectrofotómetro a 340 nm a 40°C durante 10 minutos. El procedimiento aplicado en este ejemplo es el descrito por Nelson, P.H. y col., J. Med. Chem. 39, 4181-4196, 1996. Los inhibidores se diluyen en DMSO del 100%.

15 Se prepara un tampón de reacción, 100 ml, que contiene Tris-HCl 125 mM, de pH 8,0, KCl 125 mM, EDTA 3,75 mM, BSA 125 g/ml, IMP 0,0625 mM y NAD 0,125 mM. Se prepara un diluyente de enzima, 100 ml, que contiene Tris-HCl 100 mM, de pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 3,0 mM y BSA 100 g/ml.

20 Se diluye la enzima IMPDH-II hasta 0,0065 U/ml en el diluyente de enzima. La concentración final de la enzima en la cubeta de reacción es de 0,00065 U/ml. Las muestras (derivados) se disuelven en DMSO hasta 1 mg/ml. Las muestras se diluyen después con DMSO del 100%. Todas las diluciones se preparan recientes, a partir de patrones 1 mM preparados previamente.

25 El formato de ensayo es el siguiente: se introducen 800 μ l de tampón de reacción en 6 cubetas en un espectrofotómetro. Se añaden 100 μ l de DMSO solamente (control) o de concentraciones de muestra por derivado conjugado/MPA a ensayar. Se mezcla el contenido de las cubetas con el tampón de reacción y la muestra por inversión. Se mantienen en incubación las cubetas con tampón de reacción y muestra a 40°C durante 5 minutos. Se inicia la reacción con la adición de 100 μ l de solución de enzima. Se mezcla de nuevo el contenido de la cubeta por inversión. Se hace el seguimiento de las reacciones a 340 nm y se registran los datos durante 10 minutos. Los resultados se emplean para determinar las IC_{50} de las muestras.

30 Se prepara el MPA-isoprenilo (racémico; compuesto 3A), por hidrólisis del grupo éster con hidróxido de litio y desprotección del grupo TBDPS del compuesto (3) con arreglo a métodos que los expertos en la materia ya conocen. El MPA-isoprenilo quiral (3B), isómero R, se obtiene por alquilación del análogo [(S)-4-bencil-2-oxazolidinon-1-il] imida [Rohloff y col., Tetrahedron Lett. 36, 7803-7806, 1995] del compuesto (2), en la posición 5', con el bromuro de alquilo (1) de manera similar a la descrita para la síntesis del compuesto (3); después se realiza la desprotección del grupo TBDPS y la hidrólisis del grupo oxazolidinilo aplicando métodos que los expertos en química orgánica ya conocen.

TABLA 13

Constantes de inhibidor

Derivados de MPA	IC_{50}
MPA	$2,6 \times 10^{-8}$ M
MPA-MPA	$3,2 \times 10^{-8}$ M
MPA-isoprenilo (quiral, enantiómero R, compuesto 3B)	$1,3 \times 10^{-8}$ M
MPA-isoprenilo (racémico, compuesto 3A)	$4,8 \times 10^{-8}$ M
5'-digoxigenin-3-il- β -amidometil)-MPA (isómero B, quiral posiblemente enantiómero R, compuesto 16B)	$6,8 \times 10^{-8}$ M
5'-digoxigenin-3-il- β -amidometil)-MPA (isómero A, quiral posiblemente enantiómero R, compuesto 16A)	$1,7 \times 10^{-7}$ M
5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetil-carbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (racémico, 26)	$1,7 \times 10^{-7}$ M
5'-[(isopreniloxicarbonilamino-etilenoamido)-tiroxina]-MPA (11)	$8,3 \times 10^{-8}$ M*
5'-[(teofilina-8-butiramidoetil-aminocarboniloxi)isoprenil]-MPA (20)	$2,5 \times 10^{-7}$ M*

En esta tabla se recogen los datos IC_{50} obtenidos para varios derivados de MPA. Los datos de las IC_{50} son la concentración molar del inhibidor MPA que reduce la actividad de la enzima en un 50%. Se determinan los valores IC_{50} aplicando un ajuste no lineal de la curva de la actividad fraccionada (cantidad de enzima y cantidad de analito-MPA/enzima sin ningún analito-MPA) en el eje Y frente a la concentración molar del analito-MPA de la mezcla ensayada en el eje X. Para el ajuste no lineal se emplea el programa informático Sigma-Plot 4.0 aplicando la fórmula de regresión; declive hiperbólico, 2 parámetros, $y = ab/(b+x)$, en la que y = actividad fraccionada, x = concentración molar del inhibidor, $a = 1$ y $b = IC_{50}$.

Los resultados de la IC_{50} indican la importancia de la quiralidad de la posición 5' de los inhibidores de la IMPDH que son derivados del MPA y la geometría especial de nuestros enantiómeros más potentes es consistente con lo descrito por Smith, D.B. y col., Journal of Organic Chemistry **61**, 2236-2241, 1996.

El derivado MPA-MPA se emplea como prototipo de conjugado analito-MPA que tiene un fármaco (MPA) unido a la estructura original MPA en la posición 4' ó 5'. Dado que se ha demostrado que el MPA-MPA es un prototipo de conjugado analito-MPA empleado en un inmunoensayo del MPA, una medida del valor IC_{50} de este inhibidor podría ser un indicativo del éxito de un inmunoensayo no solo para el MPA sino también para nuevos analitos. Por ejemplo, el MPA-tiroxina-isoprenilo tiene un valor IC_{50} más bajo y presenta una mayor sensibilidad en el inmunoensayo que el MPA-teofilina. Además, los derivados quirales son inhibidores más potentes de la IMPDH, lo cual es consistente con una publicación anterior, que indica que el enantiómero S de un derivado de MPA es más potente, véase J. Org. Chem. **61**, 2236-2241, 1996.

*Los valores IC_{50} de estos conjugados se determinan empleando un método ligeramente diferente. Para estos conjugados, la cantidad de enzima con y sin MPA se determina del modo descrito en el ejemplo 20 para la tiroxina y en el ejemplo 29 para la teofilina, excepto que el anticuerpo se añade al segundo reactivo y solamente se emplea como muestra la solución salina. Los reactivos segundos múltiples, que contienen en cada caso una concentración diferente de MPA, se ensayan en el aparato HITACHI 917. El primer reactivo es el descrito en los ejemplos 20 y 29 sin modificación. Se traza una gráfica de las cantidades fraccionadas obtenidas con estas concentraciones diferentes de MPA frente a la concentración molar del MPA y la IC_{50} se calcula del modo descrito.

Ejemplo 31

Síntesis del (digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO (24)

Se disuelven 1,35 g (9,2 mmoles) de diamino-dioxa-octano en 1,3 ml de trietilamina y 15 ml de dioxano y se agitan a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añade en 15 min con un embudo de decantación una solución de 500 mg (0,92 mmoles) de digoxigenina-3-cme-NHS en 10 ml de dioxano. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora se evapora el disolvente y se disuelve el producto en bruto en 10 ml de metanol y se purifica por HPLC prep. en fase inversa (Waters Delta Pak C-18 50x250 mm, agua/acetonitrilo/0,1% TFA). Se recogen las fracciones puras y se liofilizan, obteniéndose 520 mg de un producto aceitoso.

Ejemplo 32

Síntesis del [(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (28)

A una solución de 41 mg (0,1084 mmoles) del dicarboxi-MPA (compuesto 27, ejemplo 43) en 820 μ l de THF se le añaden 8,77 μ l (0,1084 mmoles) de piridina y 15,3 μ l de anhídrido trifluoracético y se agita la mezcla durante 3 horas. Se añaden 69,3 mg (0,1084 mmoles) del (digoxigenin-3-iloximetilcarbonil-DADOO) disueltos en 820 μ l de piridina y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. Se diluye la mezcla reaccionante con 1 ml de ácido acético y se purifica por HPLC preparativa en fase inversa (Waters Delta Pak C-18 50 x 250 mm, agua/acetonitrilo/0,1% TFA). Se reúnen las fracciones que contienen producto y se liofilizan, obteniéndose 66 mg. El producto se caracteriza por RMN- H^1 y EM.

Ejemplo 33

Obtención del conjugado éster metílico del ácido 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)-isoprenil]-MPA [OMEM] (18)

A 23 mg (0,045 mmoles) del éster metílico del ácido 5'-isoprenil-[OH]-MPA [OMEM] (5) se les añaden 1,5 ml de THF y después 20 mg (0,078 mmoles) de carbonato de N,N'-disuccinimidilo y 20 μ l de trietilamina. Se mantiene la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas, obteniéndose el correspondiente carbonato de N-hidroxisuccinimidilo.

Se disuelve la teofilina-amina (17), 14 mg (0,045 mmoles), en 1 ml de DMF anhidra y se le añaden 100 μ l de trietilamina. A esta solución se le añade por goteo la solución preparada previamente de MPA-carbonato de N-hidroxisuccinimidilo (generada "in situ"). Se purifica la solución por HPLC preparativa en fase inversa (Rainin C-18 (ODS),

ES 2 298 146 T3

21,4 mm x 250 mm) empleando un sistema de gradiente agua/acetonitrilo que contiene un 0,1% de ácido trifluoracético. Se reúnen las fracciones que contienen producto, se evapora el acetonitrilo y se liofiliza la mezcla restante, obteniéndose 10 mg (0,011 mmoles, 26%) del compuesto 18.

5

Ejemplo 34

Obtención del conjugado 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarbonilo)isoprenil]-MPA [OMEM] (19)

10 A una solución de 11,7 mg (0,014 mmoles) del conjugado de éster metílico del ácido 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarbonilo)isoprenil]-MPA [OMEM] (18) en 2,4 ml de metanol agitada en atmósfera de argón se le añade una solución de 24 mg (0,572 mmoles) de hidróxido de litio monohidratado en 1,2 ml de agua. Se agita la mezcla reaccionante a temperatura ambiente en atmósfera de argón, haciendo un seguimiento de su progreso por HPLC-RP (Vydac C-18; 300 Å 218TP54; 4,6 mm x 250 mm; gradiente de 0,1% TFA-H₂O/0,1% TFA-CH₃CN). Después de 4
15 días a temperatura ambiente, los materiales de partida están prácticamente consumidos, con aspecto creciente del pico de tiempo de retención más corto. Se acidifica la mezcla reaccionante con ácido fosfórico diluido (se forma un precipitado), se concentra a sequedad, se tritura con metanol y se separan los sólidos por filtración. Se concentra el líquido filtrado a sequedad, se disuelve de nuevo el residuo en CH₃CN-H₂O (1:1) y se purifica por HPLC preparativa en fase inversa (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) empleando un gradiente de 0,1% TFA-H₂O/0,1% TFA-CH₃CN.
20 Se reúnen las fracciones que contienen producto, se elimina el acetonitrilo por evaporación a presión reducida y se liofiliza el producto, obteniéndose 8 mg (0,0097 mmoles, 69%) del compuesto (19) en forma de sólido blanco.

Ejemplo 35

25

Obtención del 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarbonilo)isoprenil]-MPA (20)

A una solución de 1,0 mg (0,0012 mmoles) del conjugado 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarbonilo)isoprenil]-MPA [OMEM] (19) en 200 µl de cloruro de metileno seco se le añade en atmósfera de argón y enfriando con un
30 baño de hielo una solución enfriada de 20 µl de ácido trifluoracético disueltos en 40 µl de cloruro de metileno en 3 porciones durante aprox. un minuto. Después de agitar durante 20 minutos manteniendo el enfriamiento se evaporan los materiales volátiles por aspiración directa con alto vacío. La HPLC-RP (Vydac C-18; 300 Å 218TP54; 4,6 mm x 250 mm; gradiente de 0,1% TFA-H₂O/0,1% TFA-CH₃CN) y la RMN-H¹ (CD₃OD) del residuo indican la formación parcial del producto deseado desprotegido de MEM. Se reúnen de nuevo las existencias de este material, se concentran a sequedad, se disuelven de nuevo en cloruro de metileno seco y concentran de nuevo (3 veces). Se somete de nuevo
35 al residuo a un tratamiento de TFA del modo descrito antes, pero agitando durante 35 minutos. Los disolventes se eliminan del modo indicado antes. Los análisis por HPLC-RP y RMN-H¹ del residuo indican la ulterior formación del producto deseado y el consumo de los materiales de partida. Se reúne el material restante, se concentra de nuevo, se trata del modo indicado antes y se somete de nuevo a un tratamiento con TFA del modo descrito antes hasta una
40 tercera vez, agitando durante 30 minutos. El análisis por HPLC-RP de la mezcla reaccionante resultante indica que la reacción ha completado en su práctica totalidad, aumentando los picos de los productos secundarios. Se concentra la mezcla reaccionante a sequedad, se disuelve de nuevo con CH₃CN y se purifica por HPLC semi-preparativa en fase inversa (Vydac C-18; 300 Å 218TP510; gradiente de 0,1% TFA-H₂O/0,1% TFA-CH₃CN). Se reúnen las fracciones que contienen producto, se elimina el CH₃CN por evaporación a presión reducida y se liofiliza el residuo, obteniéndose
45 unos 0,5 g (~0,00068 mmoles, ~56%) del compuesto (20) en forma de sólido blanco.

Ejemplo 36

Obtención del éster metílico del ácido 5'-t-butoxicarbonilmetil-MPA (21)

En atmósfera de argón se enfría en un baño de acetona/hielo seco a -78°C una solución de 26 ml (26 mmoles) de bis(trimetilsilil)amida sódica (solución 1,0 M en THF). A esta solución enfriada se le añaden 2,6 ml (22 mmoles) de DMPU y se mantiene en agitación a -78°C durante 15 minutos. A la mezcla reaccionante se le añade por goteo una
55 solución de 2,86 g (8,56 mmoles) de éster metílico del MPA (2) en 45 ml de THF recién destilado. Se mantiene la mezcla reaccionante en agitación a -78°C durante 1 hora y el color de la mezcla reaccionante vira del amarillo pálido al amarillo-anaranjado. A la mezcla reaccionante se le añaden 1,9 ml (912,8 mmoles) de bromoacetato de t-butilo y se mantiene la mezcla reaccionante en agitación a -78°C durante 3 horas. Se interrumpe la reacción con 20 ml de una solución saturada de cloruro amónico y se deja calentar la mezcla a temperatura ambiente. Se añaden otros 200 ml de
60 una solución saturada de cloruro amónico y se extrae la mezcla reaccionante con 3 x 200 ml de acetato de etilo. Se reúnen las fases orgánicas, se lavan con 300 ml de una solución saturada de cloruro amónico, se secan y se concentran. Se purifica el producto en bruto por cromatografía de columna a través de gel de sílice empleando hexano al 30% en acetato de etilo, obteniéndose 3,87 g de un semisólido. Se purifica una porción de este producto (1,45 g) por HPLC-RP (Rainin C-18 (ODS) 21,4 mm x 250 mm) empleando un sistema de gradiente de acetonitrilo/agua que contiene un
65 0,1% de ácido trifluoracético, en varias operaciones. Se reúnen las fracciones que contienen producto y se evapora el acetonitrilo. Se liofiliza el producto, obteniéndose 669 mg (1,49 mmoles, 47%) del éster metílico del ácido 5'-t-butoxicarbonilmetil-MPA (21).

Ejemplo 37

Obtención del éster metílico del ácido 5'-carboximetil-MPA (22)

A 300 mg (0,67 mmoles) del éster metílico del ácido 5'-t-butoxicarbonilmetil-MPA (21) se les añaden 15 ml de una solución de ácido trifluoroacético al 50% en diclorometano. Se mantiene la mezcla en agitación a temperatura ambiente y se concentra. Se purifica el residuo por cromatografía de columna a través de gel de sílice empleando metanol al 20% en acetato de etilo, obteniéndose 250 mg (0,63 mmoles, 95%) del éster metílico del ácido 5'-carboximetil-MPA (22).

Ejemplo 38

Rotura del éster t-butílico (método alternativo)

A una solución de 360 mg (0,8 mmoles) del compuesto (21) en 3,6 ml diclorometano se le añaden 3,6 ml de TFA y se agita la mezcla reaccionante durante 10 minutos. Se añaden 200 ml de un tampón fosfato potásico 0,5 M de pH 7,0 y se extrae la mezcla tres veces con 100 ml de acetato de etilo. Se reúnen las fases orgánicas, se secan con sulfato magnésico y se evapora el disolvente. Se caracteriza el producto por HPLC y por RMN-¹H.

Ejemplo 39

Obtención del éster metílico del ácido 5'-(succinimido-N-oxi)carbonilmetil-MPA (23)

A 200 mg del éster metílico del ácido 5'-carboximetil-MPA en bruto (22) se le añaden 244 mg (2,12 mmoles) de N-hidroxisuccinimida y 437 mg (2,12 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida disueltos en 2 ml de THF y se agitan a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtra la dicitclohexilurea precipitada y se purifica el líquido filtrado por HPLC preparativa en fase inversa (Waters Delta Pak C-18 50 x 250 mm, agua/acetonitrilo/0,1% de TFA).

Se reúnen las fracciones que contienen producto y se liofilizan inmediatamente, obteniéndose 129 mg del compuesto (23). Se caracteriza el producto por RMN-¹H y EM.

Ejemplo 40

Obtención del éster metílico del ácido 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (25)

A una solución de 166 mg (0,259 mmoles) del (digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO en 3,48 ml de DMF anhidra y 179 μ l de trietilamina se le añaden con pipeta 127 mg (0,259 mmoles) del compuesto (23) en 1,74 ml de DMF anhidra. Se agita la mezcla reaccionante durante 2 horas. Después se añaden a la solución 500 μ l de ácido acético y se purifica la mezcla por HPLC preparativa en fase inversa (Waters Delta Pak C-18 50 x 250 mm, agua/acetonitrilo/0,1% TFA). Se reúnen las fracciones que contienen producto y se liofilizan, obteniéndose 240 mg de (25). El producto se caracteriza por RMN-¹H y EM.

Ejemplo 41

Obtención del 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (26)

Se mezclan lentamente 200 mg (0,2098 mmoles) del éster metílico del 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA (25) disueltos en 28,7 ml de DMSO con 56 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M de pH 7,0. La mezcla adquiere una ligera turbidez. Se añaden 21 μ l de esterasa (Roche Diagnostics, n° de catálogo = 104698) y se agita la mezcla durante 13 días. Se filtra el precipitado y se purifica el líquido filtrado por HPLC preparativa en fase inversa (Waters Delta Pak C-18 50 x 250 mm, agua/acetonitrilo/0,1% TFA). Se reúnen las fracciones que contienen producto y se liofilizan, obteniéndose 68 mg del compuesto (26). El producto se caracteriza por RMN-¹H y EM.

Ejemplo 42

Síntesis del MPA-MPA

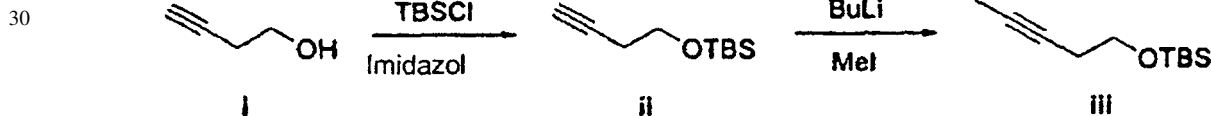
En atmósfera inerte se enfría a -78°C una solución del éster metílico del ácido micofenólico (compuesto 2, 1,337 g, 4 mmoles) en 6 ml de tetrahidrofurano y se trata con hexametildisilazida sódica (9 ml, 1 M en tetrahidrofurano, 9 mmoles) durante 25 minutos. Después de agitar durante 15 minutos se añade el bromuro de (E)-4-1,3-dihidro-6-metoxi-4-metoxietoximetoxi-7-metil-3-oxoisobenzofuran-5-il)-2-metilbut-2-enilo obtenido con arreglo a US-5,493,030 ejemplo ZA-12B (1,36 g, 3,17 mmoles) en forma de solución en tetrahidrofurano (4 ml) durante 15 minutos. Se deja

5 60% en hexanos y finalmente acetato de etilo al 80% en hexanos se obtiene el producto de la alquilación en forma de aceite (191 mg) que se emplea para la reacción siguiente.

10 reducida y se reparte la mezcla reaccionante entre agua y acetato de etilo. Se lava la fase acuosa con 75 ml de acetato de etilo, después se reúnen las fases orgánicas y se secan con sulfato magnésico. Por filtración y posterior eliminación del disolvente se obtienen 150 mg de material, que se emplea para el último paso.

15 litio. Se agita la mezcla reaccionante con varilla magnética en atmósfera de nitrógeno a 60°C durante 20 horas, después
se enfría, se vierte sobre una solución 1 M de NaHSO_4 y se extrae tres veces con acetato de etilo (50 ml x 3). Se reúnen
las fases orgánicas, se lavan con una solución saturada de salmuera y se secan con sulfato magnésico. Se elimina el
disolvente a presión reducida, obteniéndose el producto en bruto (101 mg) después de recrystalizarlo en éter de metilo
y t-butilo/hexanos. Por cromatografía flash de este material empleando una mezcla 1:1 de hexanos:acetato de etilo con
20 un 1% de ácido acético y otra recrystalización en acetato de etilo se obtiene el producto final (80 mg, de p.f. = 146,4-
147,4°C).

Obtención del 4'-carboximetil-MPA (27)



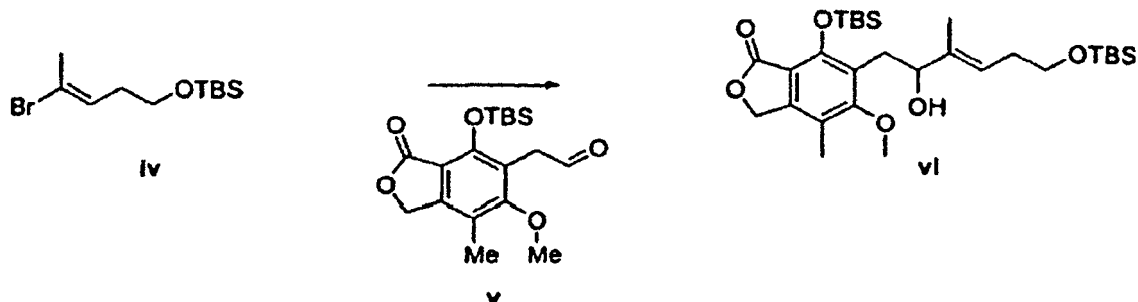
40 de metileno, se lava con agua, una solución acuosa de HCl, salmuera y se seca con sulfato magnésico. Se elimina el disolvente con vacío, se diluye el residuo con hexanos, se filtra y se elimina el disolvente con vacío, obteniéndose el éter de sililo (ii) en forma de aceite, 23,1 g, que se emplea sin más purificación.

45 ml de tetrahidrofurano y con una jeringuilla se le añade durante 15 minutos una solución de n-BuLi (31,5 ml, 50,5 ml, 1,6 M en hexanos). Se agita la solución a -78°C durante 1,5 horas, pasado este tiempo se le añade el yodometano (67,7 g, 480 mmoles) tal cual y se deja calentar la solución a temperatura ambiente durante una noche. Se añaden 20 ml de una solución acuosa 1 N de cloruro amónico, se elimina el tetrahidrofurano con vacío y se extrae la fase acuosa dos veces con éter de dietilo. Se lava la solución etérea dos veces con agua, después con salmuera y se seca
50 con sulfato magnésico. Se elimina el disolvente con vacío, obteniéndose 8,5 g del compuesto (iii) en forma de aceite, que se emplea sin más purificación.

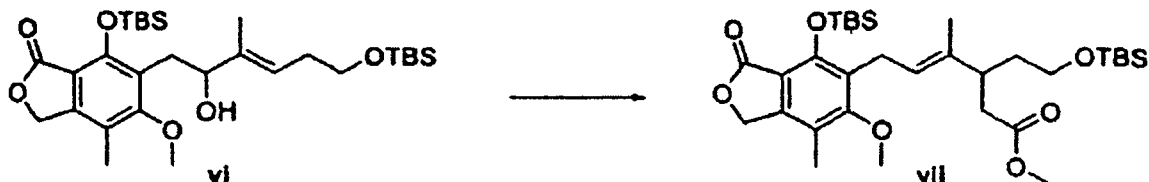


65 1M en tetrahidrofurano) y se agita la solución durante 1 hora. Con una cánula se añade la solución del éter de sililo (iii) obtenida en el paso anterior (5,0 g, 27 mmoles) en 10 ml de tetrahidrofurano. Se calienta la mezcla reaccionante a 50°C durante 1,5 horas, después se enfría a 25°C. Entonces se añade la N-bromosuccinimida (9,8 g, 55 mmoles), se agita la mezcla reaccionante durante 20 min. y se interrumpe la reacción con 50 ml de tiosulfato sódico 1N. Se

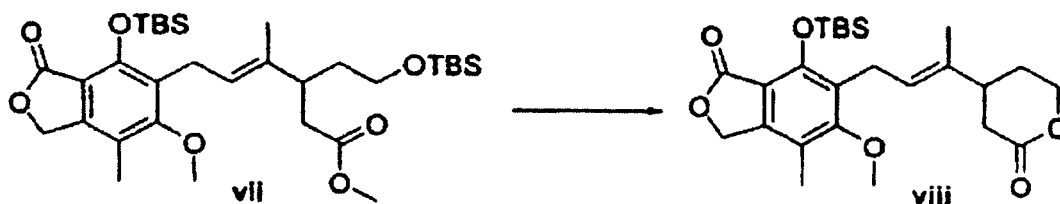
diluye la mezcla con éter de dietilo, se filtra a través de Celite y se lava sucesivamente con tiosulfato sódico 1 N y salmuera, después se seca con sulfato magnésico. Se eliminan los disolventes con vacío, obteniéndose un residuo que se cromatografía a través de gel de sílice empleando como eluyente hexanos, de este modo se obtiene el producto bromuro de vinilo (iv) en forma de aceite (2,1 g) que se emplea para el paso siguiente.



En atmósfera inerte y temperatura ambiente se agita una suspensión de magnesio (350 mg, 14 mmoles) en una mezcla de 20 ml de éter de dietilo y 5 ml benceno. A esta mezcla se le añade con una jeringuilla durante 30 minutos el dibromuro de etileno (2,7 g, 14,4 mmoles, 1,24 ml) manteniendo la mezcla reaccionante en reflujo suave. En un matraz aparte se agita a -78°C una solución del bromuro de vinilo (compuesto iv, 3,65 g, 13 mmoles) en 100 ml THF. A esta solución se le añade por goteo durante 15 minutos el tert-butil-litio (27,4 mmoles, 16,1 ml de una solución 1,7 M en hexanos). A la solución resultante de vinil-litio solución se le añade mediante una cánula durante 10 minutos la anterior solución de bromuro de magnesio y se agita la solución a 78°C durante 30 minutos para formar la solución de vinil-Grignard. A la solución del vinil-Grignard se le añade con una cánula durante 5 minutos una solución del aldehído (v) [Smith y col., J. Org. Chem. 61, 2236-2241, 1996] (5,0 g, 14,4 mmoles) en 10 ml THF. Se deja calentar la mezcla reaccionante a 0°C y se agita durante 25 minutos. Se interrumpe la reacción con 30 ml de una solución acuosa 1 N de cloruro amónico, se extrae con éter de dietilo 3 veces, se lava la solución etérea con una solución acuosa 1 N de cloruro amónico, salmuera, y se seca con sulfato magnésico. Se elimina el disolvente con vacío y se purifica el residuo por cromatografía a través de gel de sílice empleando un gradiente de acetato de etilo del 10 al 20% en hexanos, obteniéndose 2,90 g del producto alcohol alílico (vi) en forma de aceite.



Se mantiene en ebullición a reflujo durante 11 horas el alcohol alílico (vi, 2,6 g, 4,7 mmoles) en una mezcla del ortoacetato de trimetilo (11,4 g, 12,0 ml, 95 mmoles) y ácido pívico (48 mg, 0,5 mmoles). Se enfría la mezcla reaccionante y se agita a temperatura ambiente durante una noche. Se diluye la mezcla reaccionante con éter de dietilo, se lava con agua, una solución acuosa saturada de bicarbonato, salmuera, y se seca con sulfato magnésico. Se eliminan los disolventes con vacío y se cromatografía el residuo a través de gel de sílice empleando como eluyente acetato de etilo al 15% en hexanos, de este modo se obtienen 1,5 g del producto éster metílico (vii) en forma de aceite.

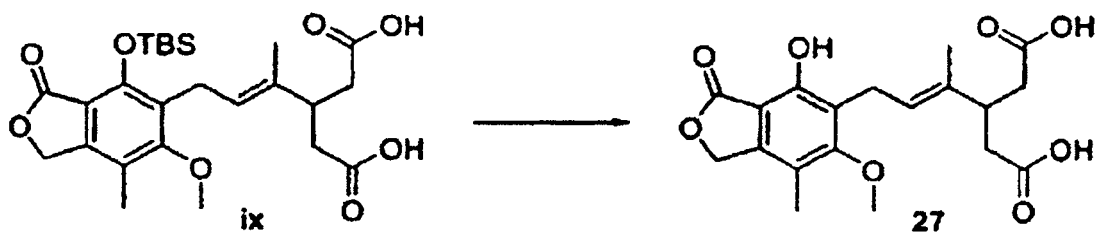


Se agita a temperatura ambiente una solución del éster metílico (vii, 1,5 g, 2,5 mmoles) en 50 ml de acetonitrilo. Se añade una solución de 5 ml de una solución de HF al 40% diluida en 50 ml de acetonitrilo y se agita la mezcla

reaccionante durante 5 minutos. Se elimina el disolvente con vacío. Se disuelve el residuo en éter de dietilo, se lava 3 veces con una solución acuosa saturada de bicarbonato, después con salmuera y se seca con sulfato magnésico. Se eliminan los disolventes, obteniéndose 1,0 g de la lactona (viii) en forma de aceite que se emplea sin más purificación.



Se disuelve la lactona (viii, 1,0 g, 2,0 mmoles) en 10 ml de acetona y se enfría a 0°C. A esta solución se le añade el reactivo de Jones (3,6 mmoles, 1,2 ml de una solución acuosa 3 M) y se agita la mezcla reaccionante durante 45 minutos. Se interrumpe la reacción con 3 ml metanol, se diluye con acetato de etilo, se lava con ácido clorhídrico acuoso 1 N, agua 2 veces, salmuera, y se seca con sulfato magnésico. Se eliminan los disolventes con vacío y se cromatografía el residuo a través de gel de sílice, empleando como eluyente acetato de etilo al 35% y ácido acético al 1% en hexanos, de este modo se obtienen 463 mg del diácido protegido (ix) en forma de aceite.



Se agita a temperatura ambiente el diácido protegido (ix, 401 mg, 0,8 mmoles) en 10 ml metanol. Se disuelve el hidróxido de litio hidratado en una solución de 10 ml de metanol y 2 ml de agua y se añade a la solución del diácido y se agita la reacción durante 3,5 horas. Se interrumpe la reacción con 10 ml ácido clorhídrico acuoso 1 N, se extrae con acetato de etilo 3 veces, se reúnen las fases de acetato de etilo y se lavan con salmuera. Se eliminan los disolventes y se tritura el sólido resultante con una mezcla de éter de dietilo y hexanos. Se recristaliza el sólido resultante en cloruro de metileno/hexanos, obteniéndose 201 mg del 4'-carboximetil-MPA (27), de p.f. = 178°C.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un analito en una muestra, que consta de los pasos de:

a. combinar una muestra, de la que se sospecha que contiene dicho analito, con un conjugado que contiene un analito o sustancia, que se comporta esencialmente igual que el analito en lo que respecta a la afinidad de fijación del anticuerpo por el analito, y ácido micofenólico (MPA) o metabolitos o derivados del ácido micofenólico capaces de inhibir la IMPDH (análogos de MPA), dichos MPA o análogos de MPA están derivatizados en la posición 4' ó 5', un receptor específico de dicho analito, IMP, NAD e ionosina-5'-monofosfato-deshidrogenasa (IMPDH) en condiciones idóneas para la actividad de la IMPDH,

b. hacer el seguimiento de la producción de la NADH, y

c. establecer la relación entre la producción de la NADH y la presencia o la cantidad de dicho analito en dicha muestra.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho analito se elige entre el grupo formado por fármacos, derivados de fármacos, hormonas, polipéptidos y oligonucleótidos.

3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho analito es el ácido micofenólico.

4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho analito es la tiroxina.

5. El método de la reivindicación 2, en el que dicho analito es la digoxigenina.

6. El método de la reivindicación 3, en el que dicho analito es la teofilina.

7. Un reactivo para determinar un analito en una muestra que consta de un analito o una sustancia, que se comporta esencialmente igual que el analito en lo que respecta a la afinidad de fijación del anticuerpo por el analito, y ácido micofenólico (MPA) o un análogo de MPA, en el que el MPA o análogo de MPA está derivatizado en la posición 4' ó 5'.

8. El reactivo de la reivindicación 7, en el que dicho analito se elige entre el grupo formado por fármacos, derivados de fármacos, hormonas, polipéptidos y oligonucleótidos.

9. El reactivo de la reivindicación 8, en el que dicho analito es el ácido micofenólico.

10. El reactivo de la reivindicación 8, en el que dicho analito es la tiroxina.

11. El reactivo de la reivindicación 8, en el que dicho analito es la digoxigenina.

12. El reactivo de la reivindicación 8, en el que dicho analito es la teofilina.

13. Un kit para realizar el ensayo de determinación de un analito en una muestra que contiene en combinación envasada:

a. un primer reactivo que contiene la NAD, y

b. un segundo reactivo que contiene el IMP, la IMPDH y un conjugado que contiene un analito o a sustancia, que se comporta esencialmente igual que el analito en lo que respecta a la afinidad de fijación del anticuerpo por el analito, y ácido micofenólico (MPA) o un análogo de MPA, dichos MPA o análogo de MPA está derivatizado en la posición 4' ó 5',

dicho primer o segundo analito contiene además un receptor específico de dicho analito.

14. El kit de la reivindicación 13, dicho kit contiene además un reactivo de calibración que contiene una cantidad conocida de dicho analito.

15. El kit de la reivindicación 13, en el que dicho analito se elige entre el grupo formado por fármacos, derivados de fármacos, hormonas, polipéptidos y oligonucleótidos.

16. El kit de la reivindicación 15, en el que dicho analito es el ácido micofenólico.

17. El kit de la reivindicación 15, en el que dicho analito es la tiroxina.

18. El kit de la reivindicación 15, en el que dicho analito es la digoxigenina.

19. El kit de la reivindicación 15, en el que dicho analito es la teofilina.

20. El compuesto L-tiroxina-5'-isoprenil-MPA.

21. El compuesto 5'-[(digoxigenin-3-il)- β -amidometil-MPA.

22. El compuesto 4'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA.

23. El compuesto 5'-[(digoxigenin-3-il)-oximetilcarbonil-DADOO-carbonilmetil]-MPA.

24. El compuesto 5'-[(teofilina-8-butiramidoetilaminocarboniloxi)isoprenil]-MPA.

25. Un conjugado de fármaco o de derivado de fármaco y ácido micofenólico (MPA) o análogo de MPA, en el que el MPA o el análogo de MPA está derivatizado en la posición 4' ó 5'.

26. El conjugado de la reivindicación 25, en el que dicho fármaco es la digoxigenina.

27. El conjugado de la reivindicación 25, en el que dicho fármaco es la teofilina.

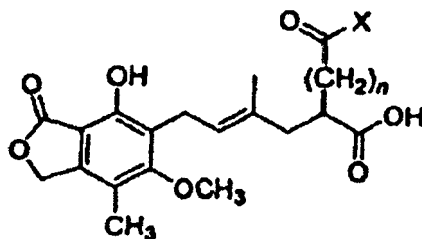
28. Un conjugado de hormona y ácido micofenólico (MPA) o análogo de MPA, en el que el MPA o el análogo de MPA está derivatizado en la posición 4' ó 5'.

29. El conjugado de la reivindicación 28, en el que dicha hormona es la tiroxina.

30. Un conjugado de nucleótido y ácido micofenólico (MPA) o análogo de MPA, en el que el MPA o el análogo de MPA está derivatizado en la posición 4' ó 5'.

31. Un conjugado de polipéptido y ácido micofenólico (MPA) o análogo de MPA, en el que el MPA o el análogo de MPA está derivatizado en la posición 4' ó 5'.

32. Un conjugado que tiene la estructura



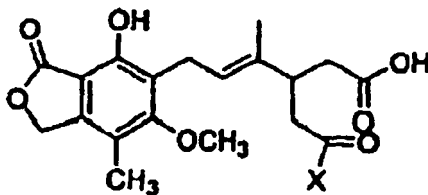
en la que $n = 1-10$ y x es un derivado de fármaco, un derivado de hormona, un polipéptido o un oligonucleótido.

33. El conjugado de la reivindicación 32, en el que $n = 1$.

34. El conjugado de la reivindicación 33, en el que $x = \text{digoxigenin-3-il-oximetilcarbonil-DADOO}$.

35. El conjugado de la reivindicación 33, en el que $x = 3\text{-amino-digoxigenina}$.

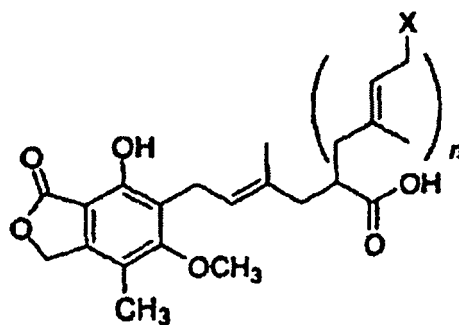
36. Un conjugado que tiene la estructura



en la que x es un derivado de fármaco, un derivado de hormona, un polipéptido o un oligonucleótido.

37. El conjugado de la reivindicación 36, en el que x = digoxigenin-3-il-oximetilcarbonil-DADOO.

38. Un conjugado que tiene la estructura

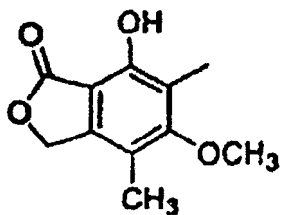


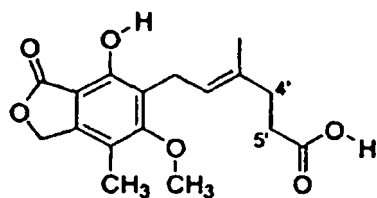
en la que n = 1-2 y x es un derivado de fármaco, un derivado de hormona, un polipéptido o un oligonucleótido.

39. El conjugado de la reivindicación 38, en el que x es -O-CONH-(CH₂)₂-NH-tiroxina.

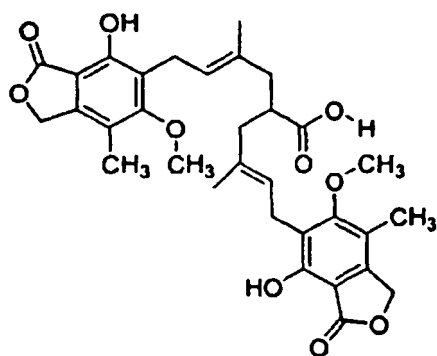
40. El conjugado de la reivindicación 38, en el que x es -O-CONH-(CH₂)₂-NHC(=O)-(CH₂)₄-teofilina.

41. El conjugado de la reivindicación 38, en el que x es





MPA



MPA-MPA

FIGURA 1

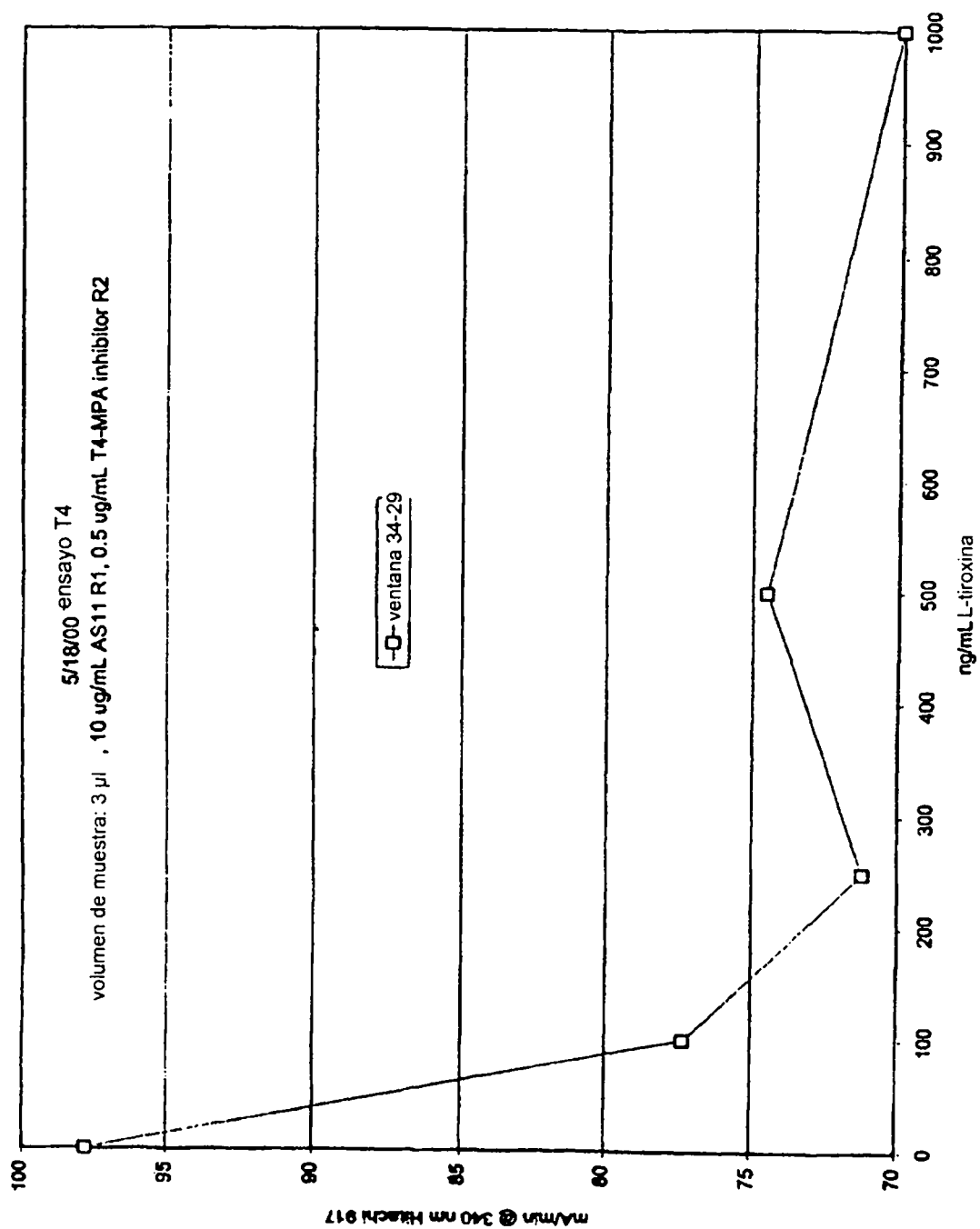


FIGURA 2

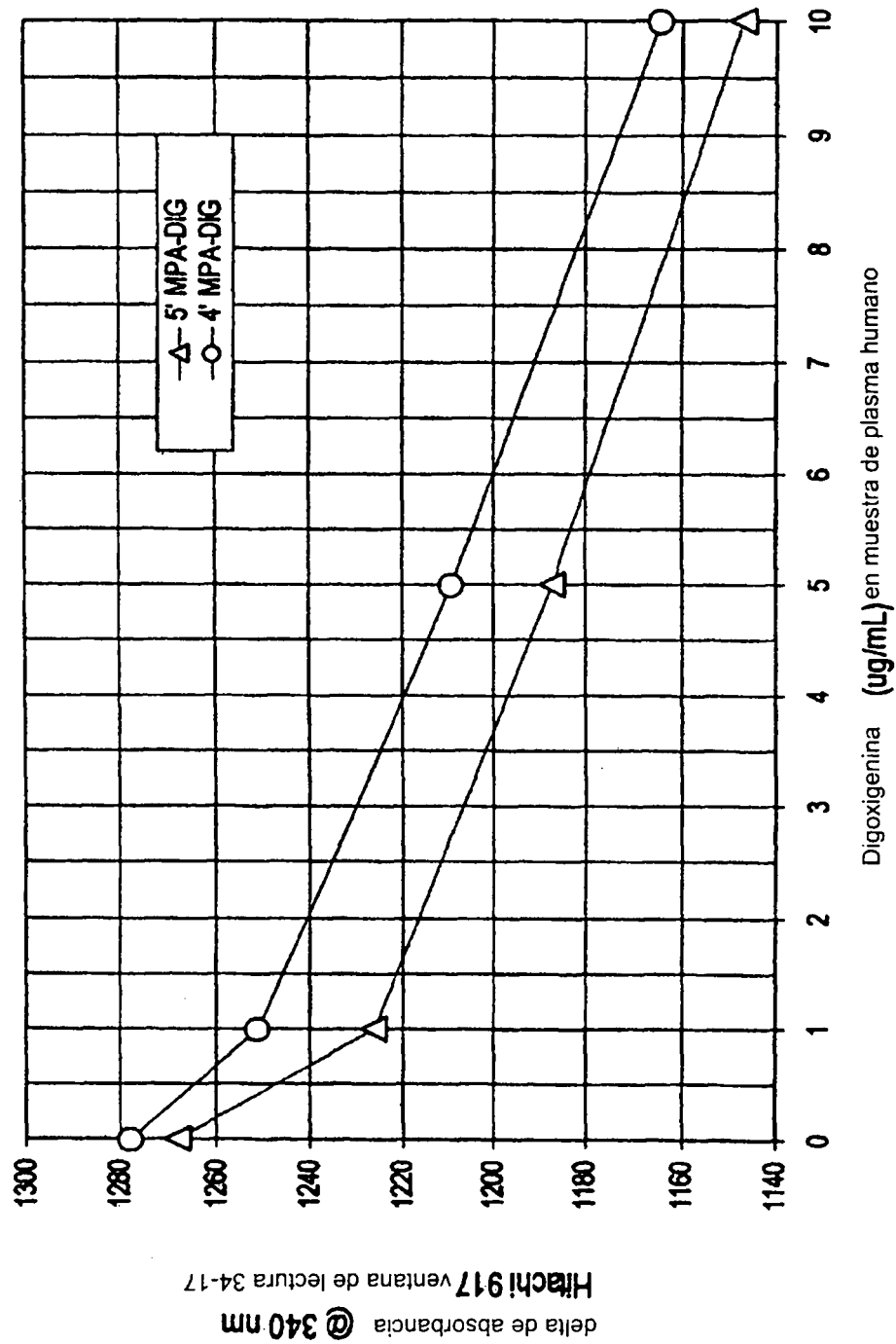


FIGURA 3

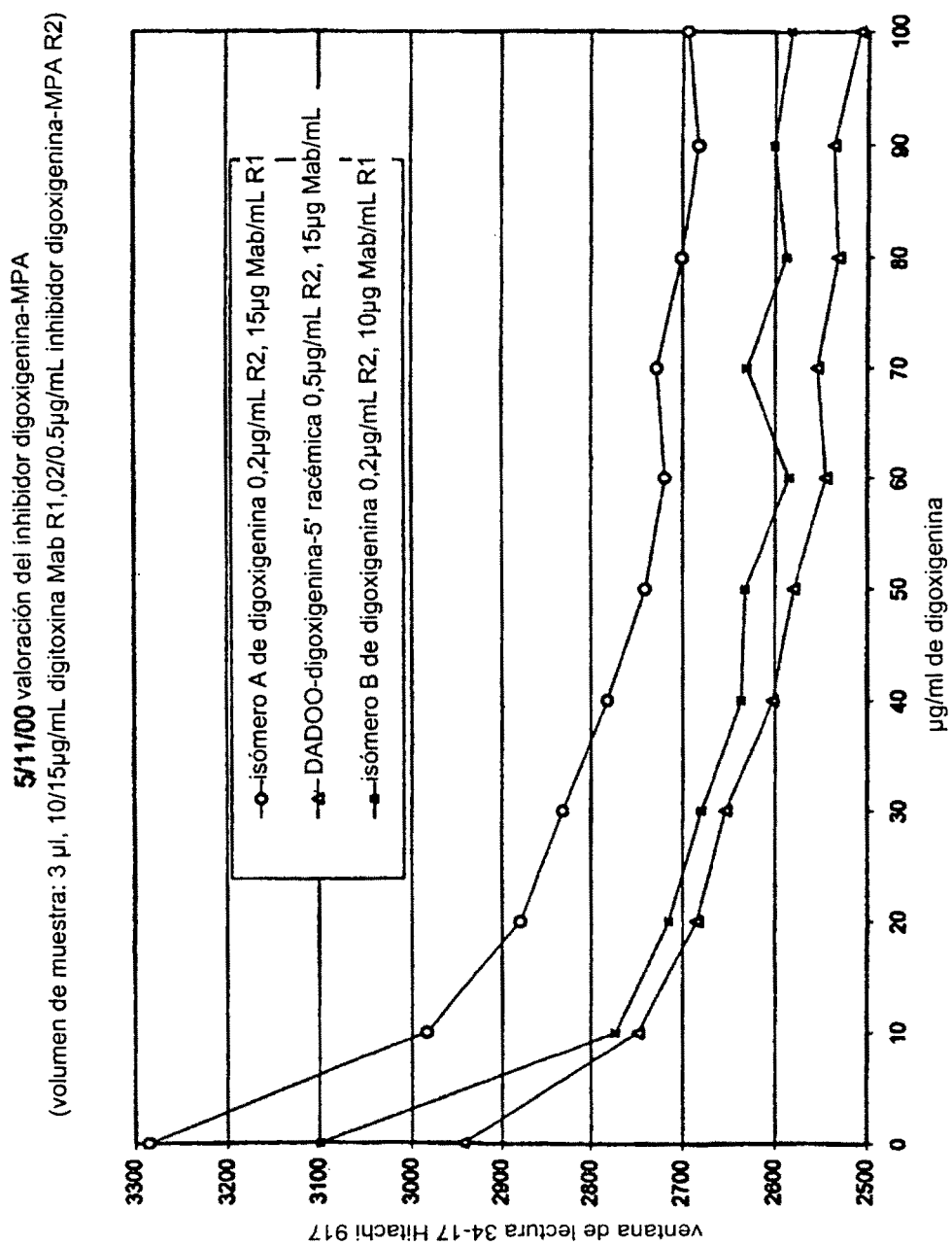


FIGURA 4

Ensayo de teofilina 6/12/00 15MAB R2, 25 MAB R2, 05µg/ml inhibidor, volumen de muestra: 3 µl

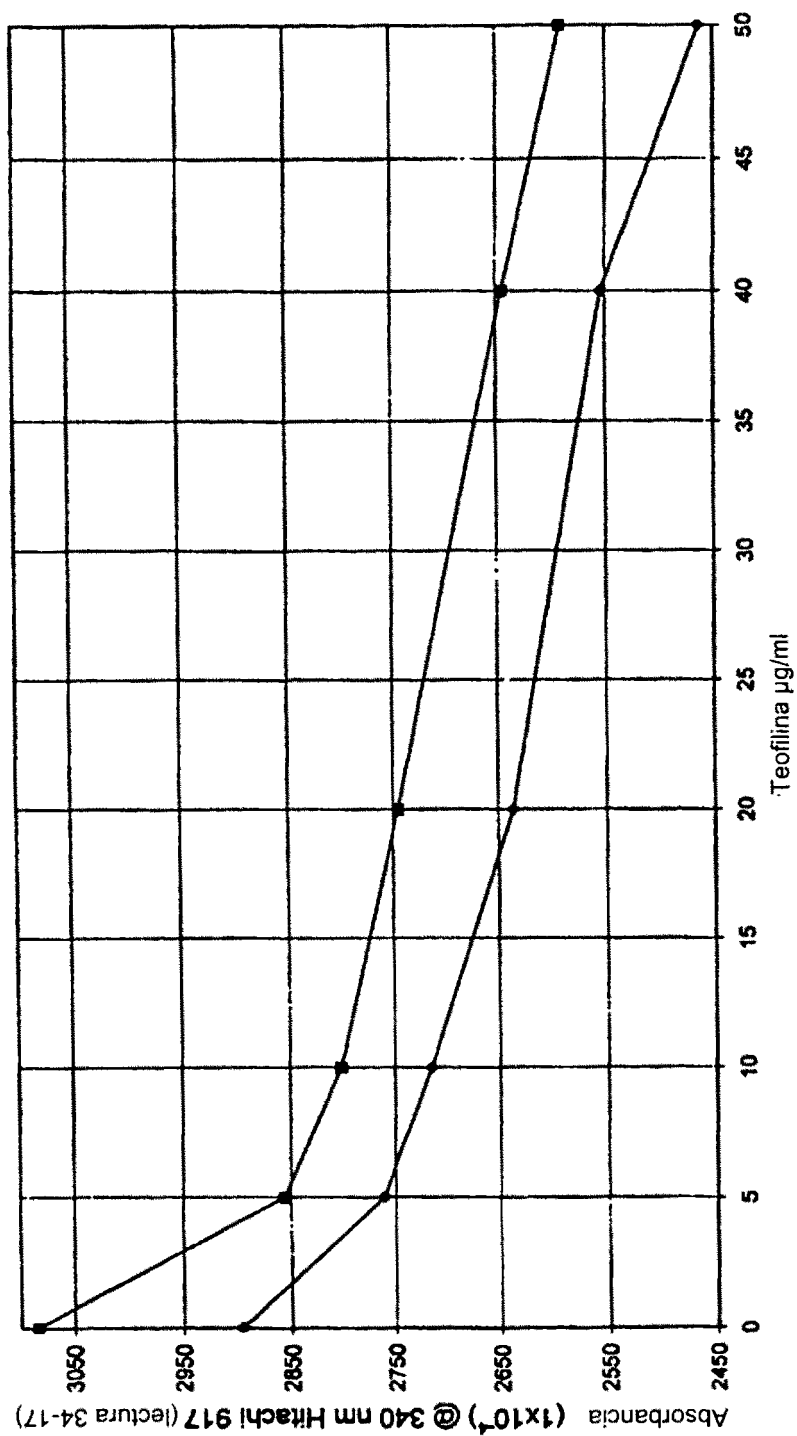


FIGURA 5

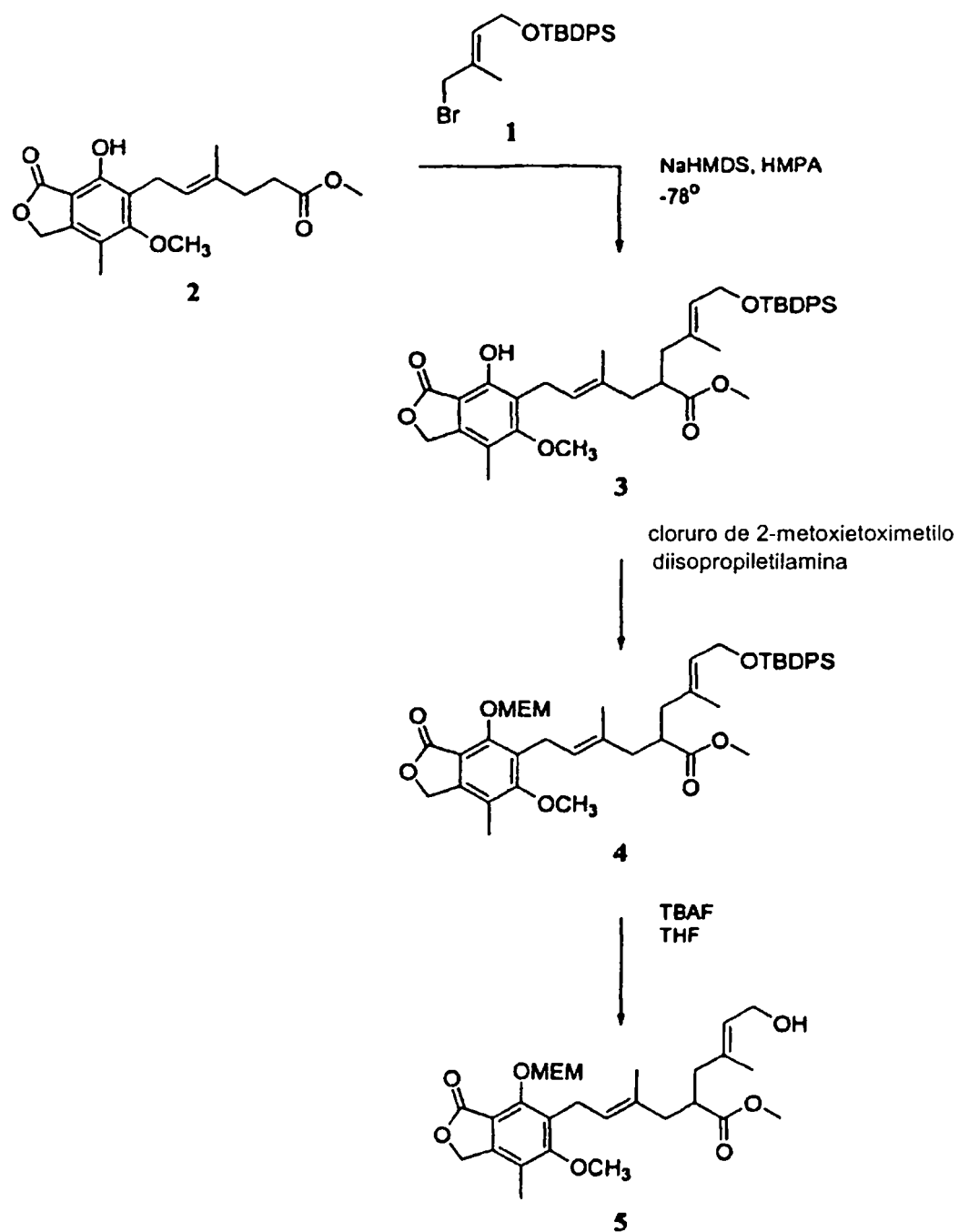


FIGURA 6

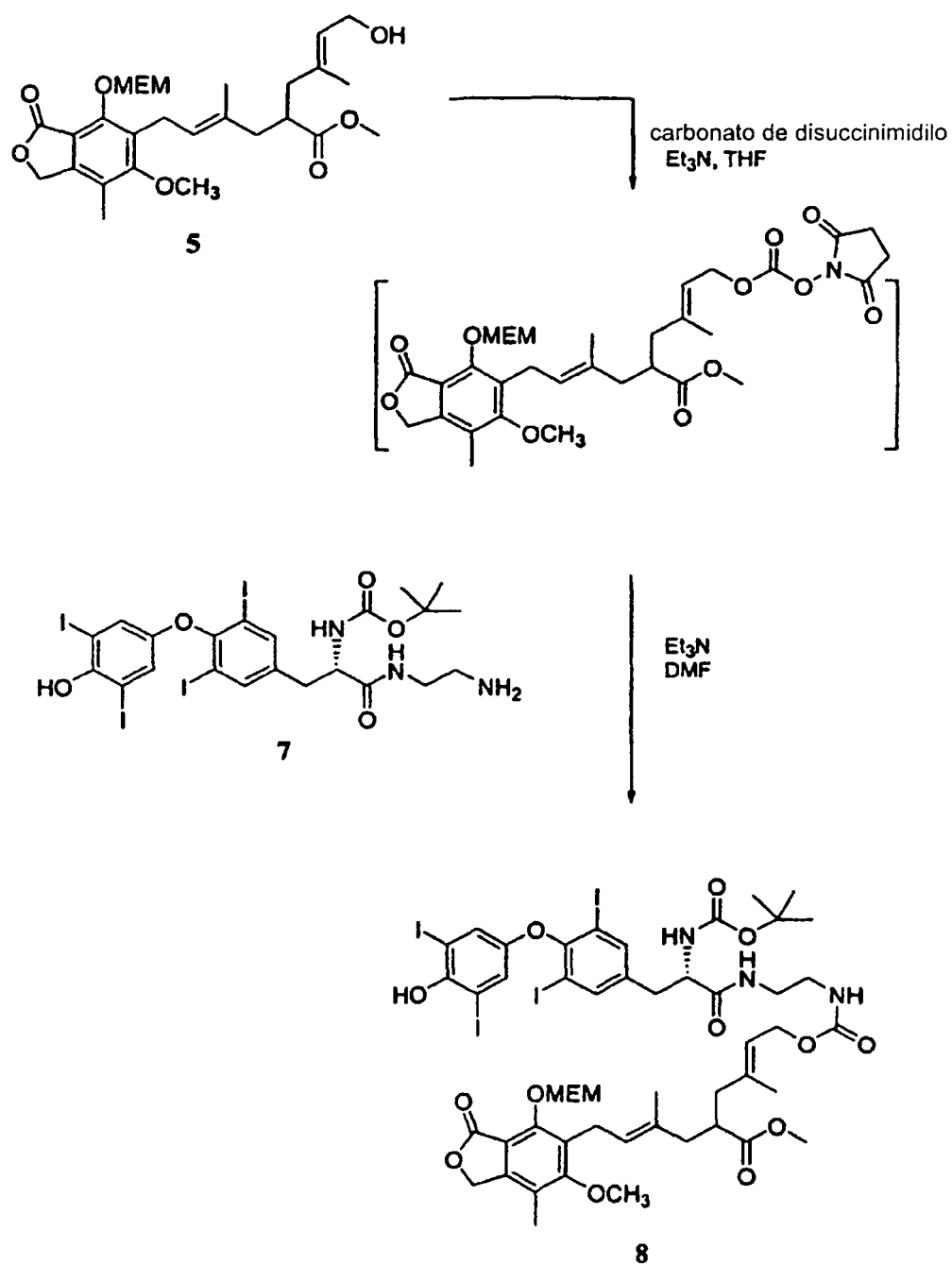


FIGURA 7

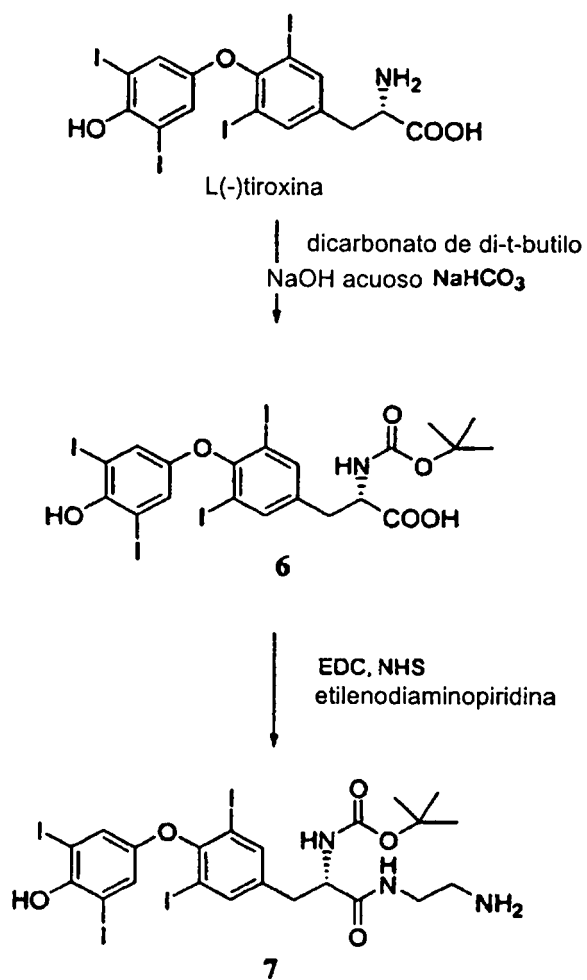


FIGURA 8

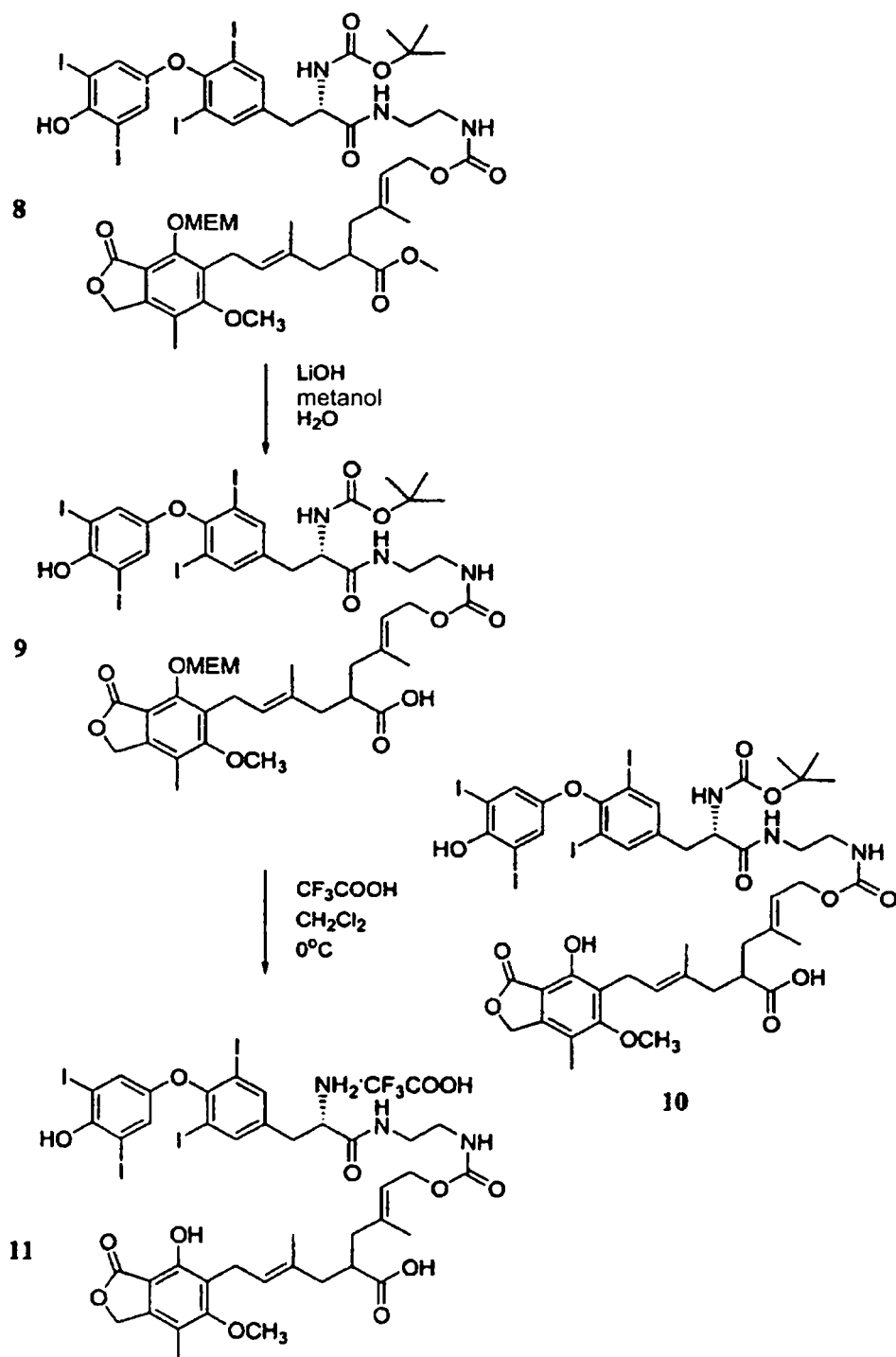


FIGURA 9

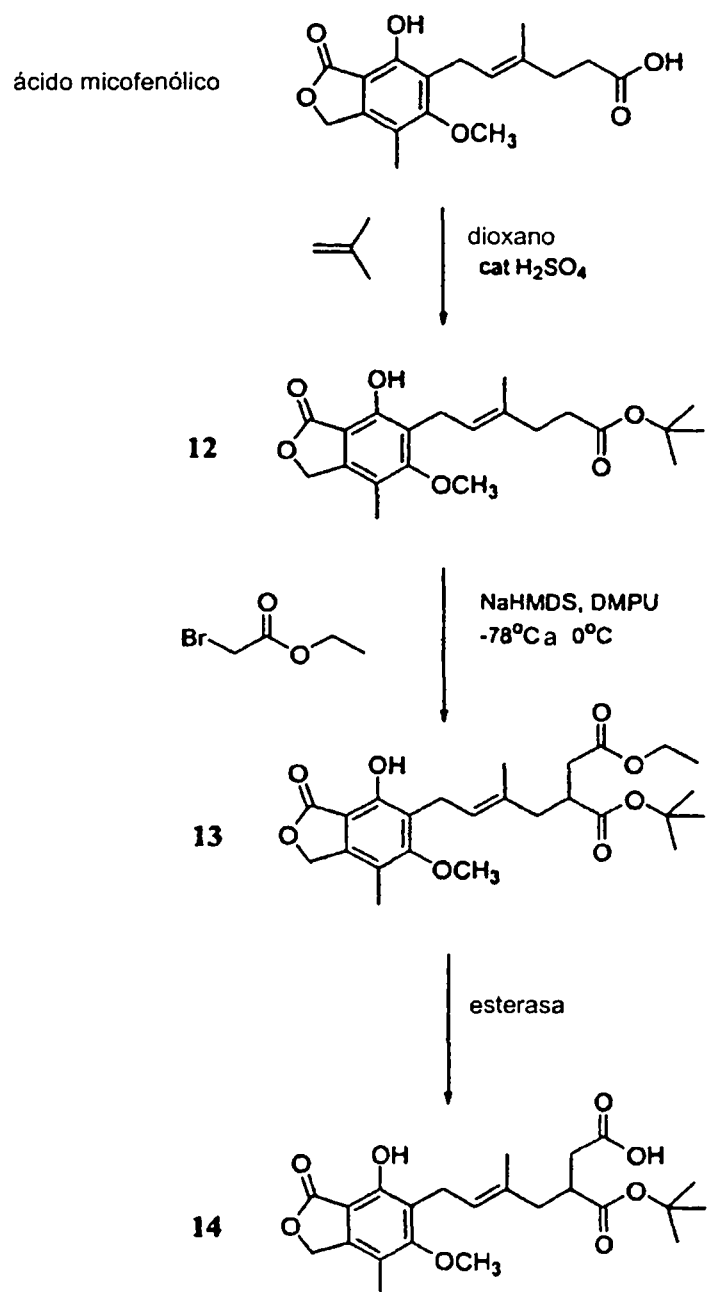


FIGURA 10

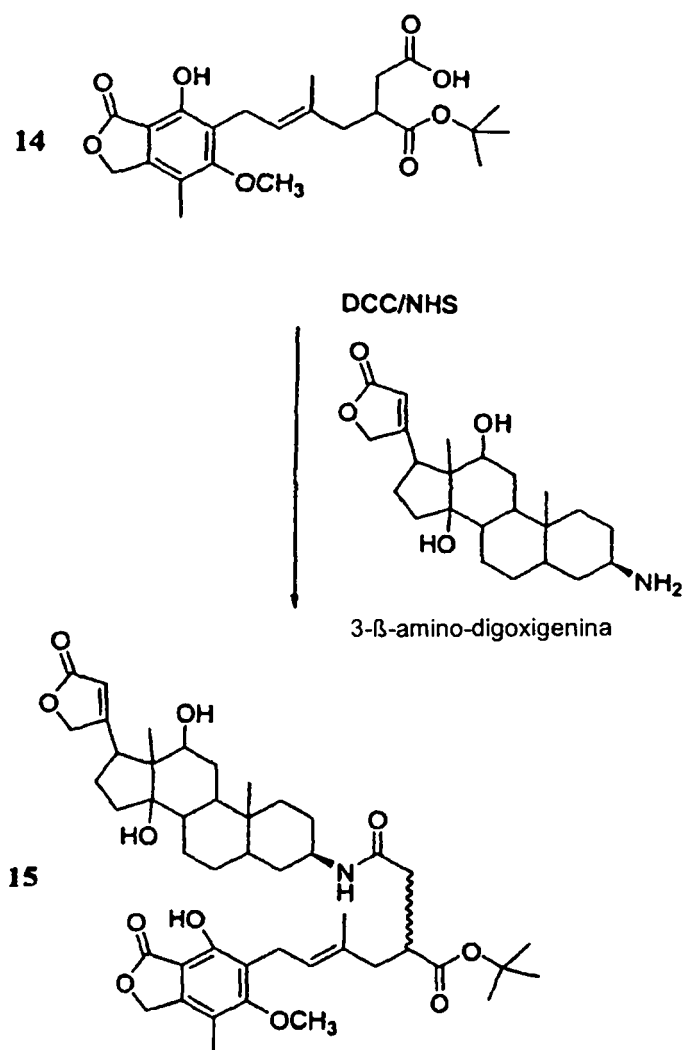


FIGURA 11

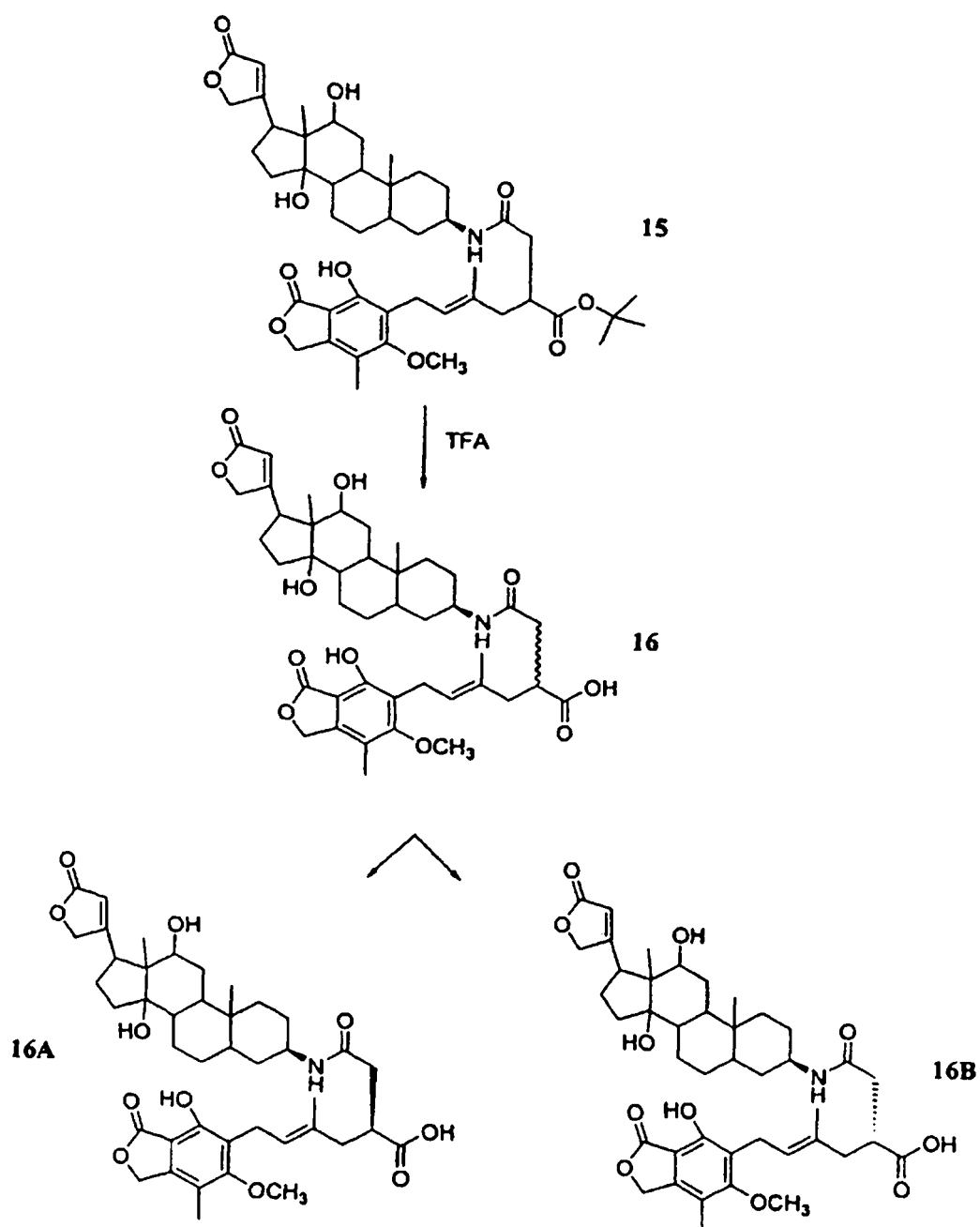


FIGURA 12

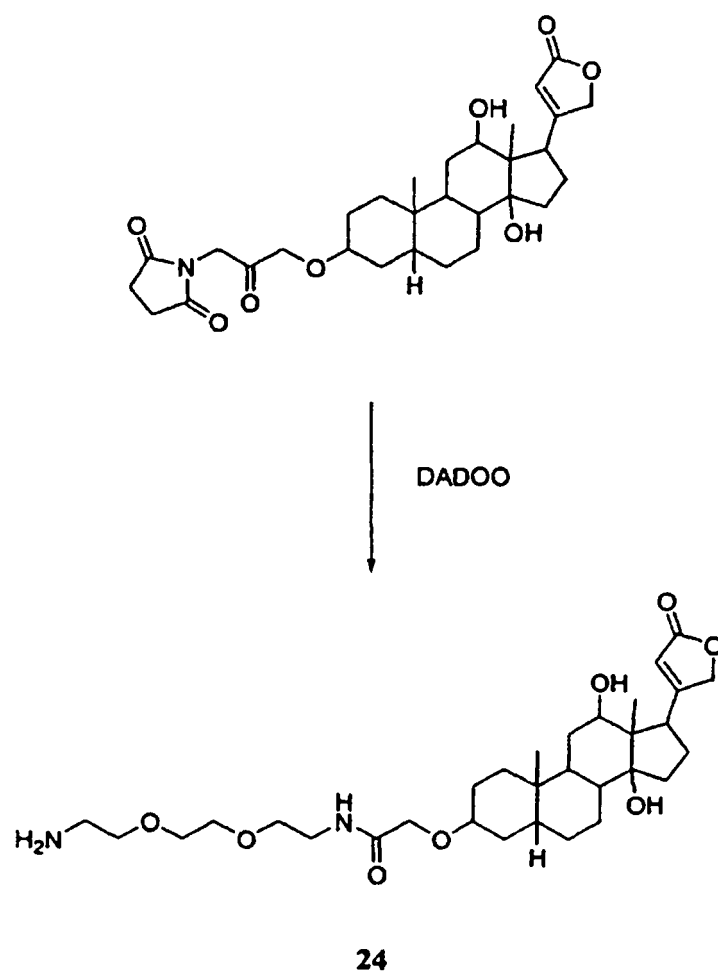


FIGURA 13

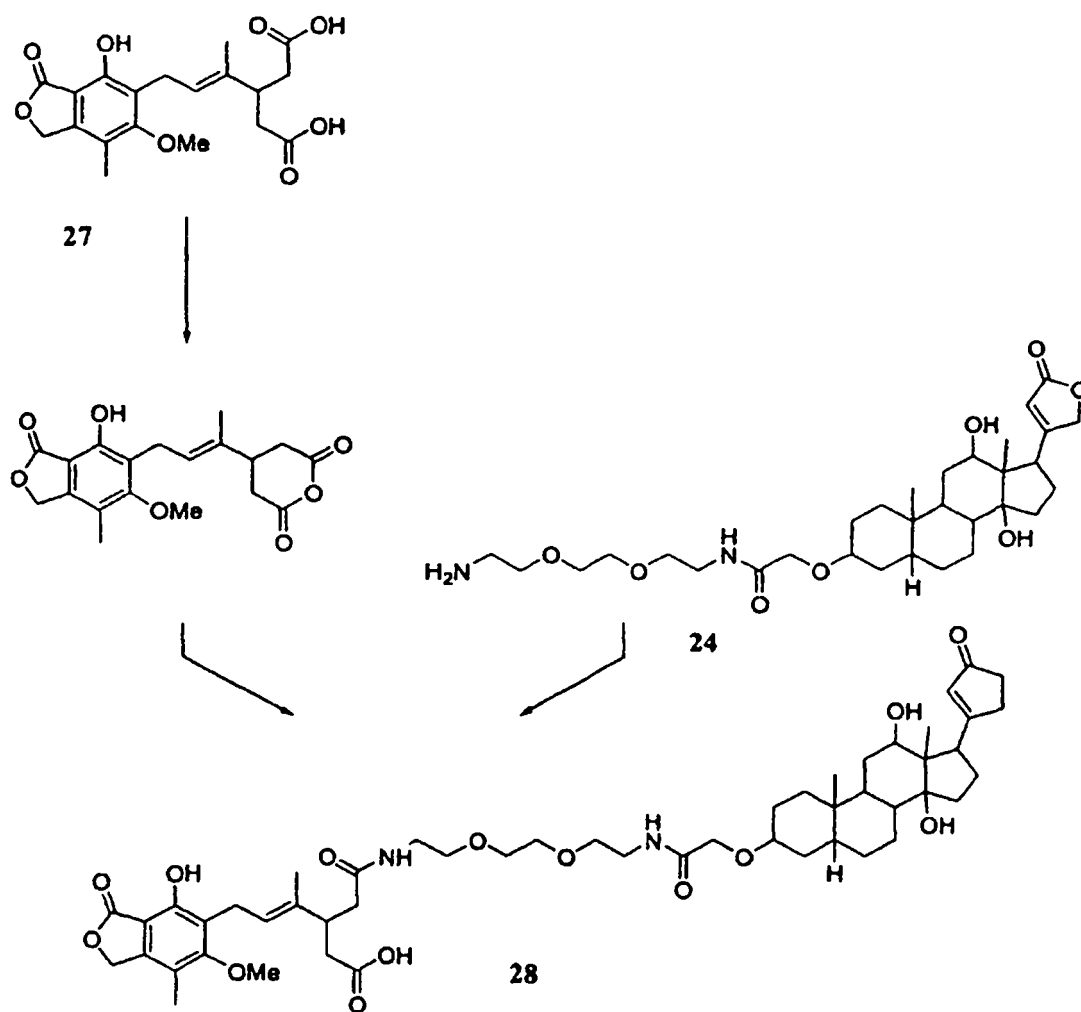


FIGURA 14

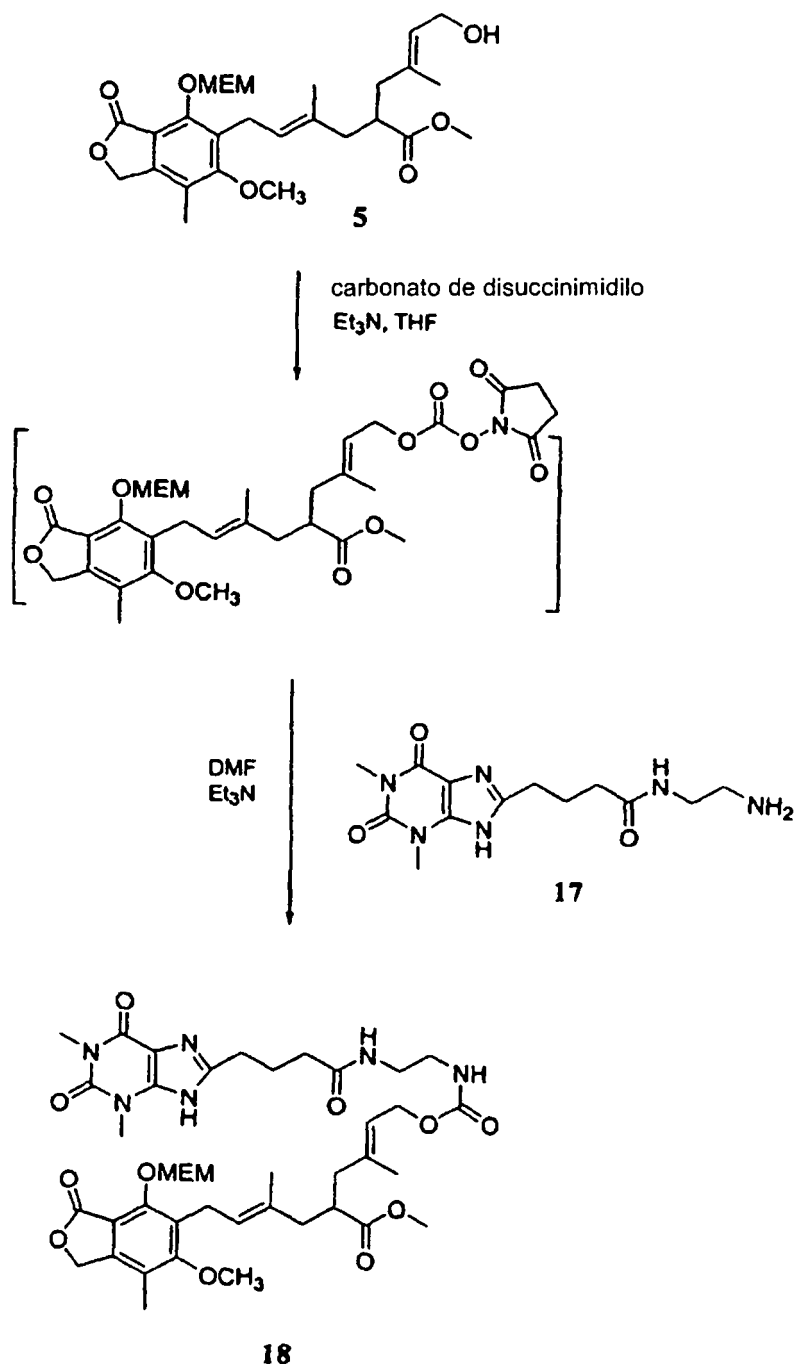


FIGURA 15

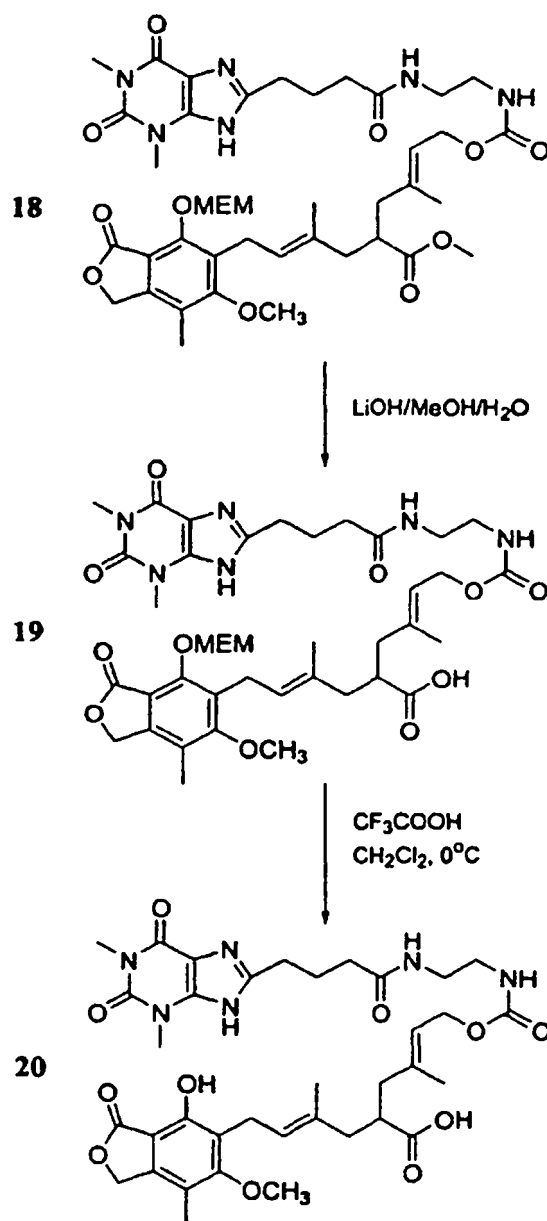


FIGURA 16

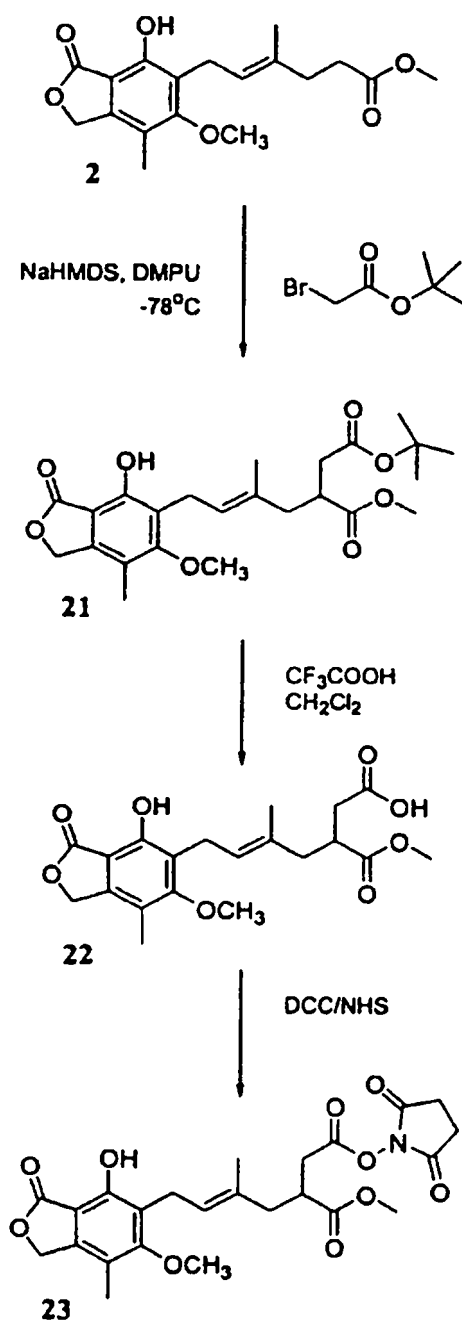


FIGURA 17

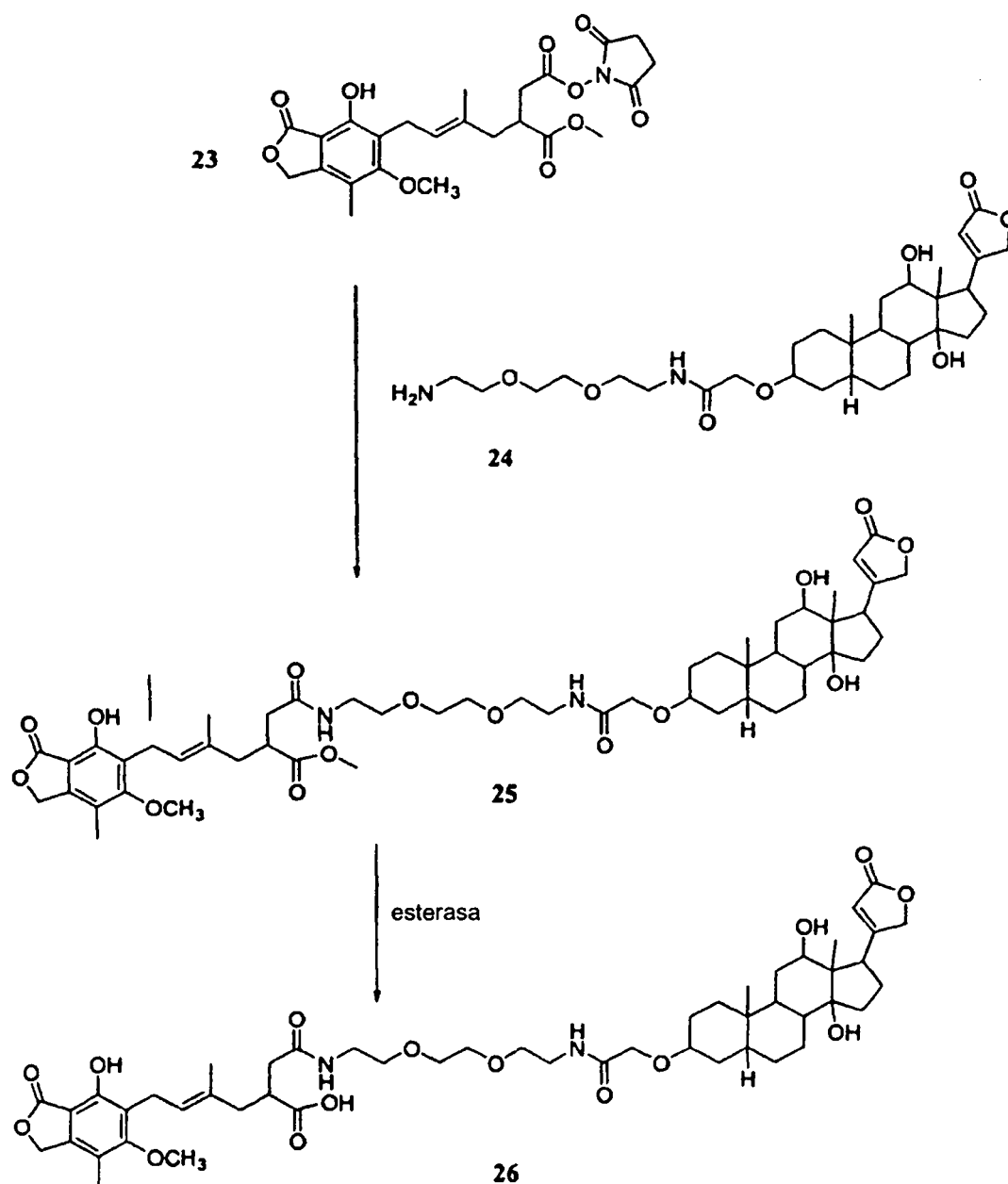


FIGURA 18