

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 506**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61K 47/64** (2007.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 19177909 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023 EP 3556759**

54 Título: **Haptenos de paliperidona**

30 Prioridad:

**21.08.2012 US 201261691459 P**

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

**05.06.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 971 506 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Haptenos de paliperidona

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona compuestos y conjugados como se define en las reivindicaciones. Tales compuestos pueden ser útiles para determinar los niveles del fármaco antipsicótico paliperidona,

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La WO2011/115733 A1 se refiere a "conjugados e inmunógenos derivados de risperidona y anticuerpos generados por estos inmunógenos que son útiles en inmunoensayos para la cuantificación y monitorización de risperidona y paliperidona en fluidos biológicos".

15 La WO2011/102715 A1 se refiere a "hidrogeles insolubles en agua a base de polietilenglicol biodegradables que comprende fracciones de estructura principal que están interconectadas por enlaces hidrolíticamente degradables".

20 La WO2011/042450 A1 se refiere a "profármacos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos que comprenden un conjugado portador de paliperidona covalente de fórmula (I)".

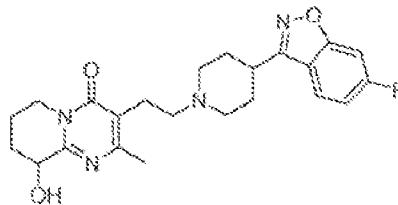
La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico crónico y debilitante que afecta aproximadamente al 0,45-1% de las enfermedades de la población del mundo (van Os, J.; Kapur, S. "Schizophrenia" Lancet 2009, 374, 635-645). Los principales objetivos del tratamiento consisten en lograr una remisión sostenida de los síntomas psicóticos, reducir el riesgo y las consecuencias de la recaída y mejorar el funcionamiento del paciente y calidad de vida en general. Si bien muchos pacientes con esquizofrenia logran la estabilidad de los síntomas con los medicamentos antipsicóticos disponibles, la falta de adherencia a la medicación es un motivo común de recaída con medicamentos orales administrados diariamente. Varios estudios (Abdel-Baki, A.; Ouellet-Plamondon, C.; Malla, A. "Pharmacotherapy Challenges in Patients with First-Episode Psychosis" Journal of Affective Disorders 2012, 138, S3-S14) investigando los resultados del incumplimiento han demostrado que los pacientes con esquizofrenia que no toman sus medicamentos según lo prescrito tienen tasas más altas de recaída, ingreso hospitalario y suicidio, así como una mayor mortalidad. Se estima que del 40 al 75% de los pacientes con esquizofrenia tienen dificultades para adherirse a un régimen de tratamiento oral diario (Lieberman, JA; Stroup, TS; McEvoy, JP; Swartz, MS; Rosenheck, RA; Perkins, DO; Keefe, RSE; Davis, S.M.; Davis, CE; Lebowitz, BD; Severo, J.; Hsiao, JK "Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia" New England Journal of Medicine 2005, 353 (12), 1209-1223). El monitoreo terapéutico de medicamentos (TDM) es la cuantificación de las concentraciones séricas o plasmáticas de medicamentos, incluidos los medicamentos antipsicóticos, para el seguimiento del tratamiento y la optimización. Dicha monitorización permite, por ejemplo, la identificación de pacientes que no se adhieren a su régimen de medicación, que no están logrando dosis terapéuticas, que no responden a las dosis terapéuticas, que tienen tolerancia subóptima, que tengan interacciones farmacocinéticas farmacológicas o que tengan un metabolismo anormal que resulte en concentraciones plasmáticas inadecuadas. Existe una considerable variabilidad individual en la capacidad del paciente para absorber, distribuir, metabolizar, y excretar antipsicóticos. Tales diferencias pueden ser causadas por enfermedad concurrente, edad, medicación concomitante o peculiaridades genéticas. Diferentes formulaciones de fármacos también pueden influir en el metabolismo de los fármacos antipsicóticos. TDM permite la optimización de la dosis para pacientes individuales, mejorando los resultados terapéuticos y funcionales. TDM además permite un médico prescriptor para garantizar el cumplimiento de las dosis prescritas y el logro de concentraciones séricas efectivas.

Hasta la fecha, los métodos para determinar los niveles de concentraciones de suero o plasma de los fármacos anti-psicóticos implican el uso de cromatografía líquida (LC) con UV o detección de espectrometría de masas y radioinmunoensayos (ver, para ejemplo, Woestenborghs et al., 1990 "On the selectivity of some recently developed RIA's" in Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis 20:241-246. Analysis of Drugs and Metabolites, Including Anti-infective Agents; Heykants et al., 1994 "The Pharmacokinetics of Risperidone in Humans: A Summary", J Clin Psychiatry 55/5, suppl:13-17; Huang et al., 1993 "Pharmacokinetics of the novel anti-psychotic agent risperidone and the prolactin response in healthy subjects", Clin Pharmacol Ther 54:257-268). Los radioinmunoensayos detectan uno o ambos de risperidona y paliperidona. Salamone et al. en la patente de EE.UU. n° 8,088,594 (y el documento WO 2011/115733 A1) describen un inmunoensayo competitivo para la risperidona utilizando anticuerpos que detectan tanto risperidona como paliperidona pero no metabolitos farmacológicamente inactivos. Los anticuerpos utilizados en el inmunoensayo competitivo se desarrollan contra un inmunógeno particular. ID Labs Inc. (Londres, Ontario, Canadá) comercializa un ELISA para la olanzapina, otra droga antipsicótica, que también utiliza un formato competitivo. Las instrucciones de uso indican que el ensayo está diseñado para fines de detección y destinado a investigación forense o uso, y no está destinado específicamente para uso terapéutico. Las instrucciones recomiendan que todas las muestras positivas deben confirmarse con cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) e indicar que el anticuerpo utilizado detecta olanzapina y clozapina (consulte ID Labs Inc., "Instructions For Use Data Sheet IDEL-F083", fecha de revisión, 8 de agosto de 2011). Algunos de estos métodos, a saber, HPLC y GC/MS, pueden ser costosos y requieren mucha mano de obra, y generalmente solo se realizan en laboratorios grandes o especializados

que cuenten con el equipo adecuado.

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

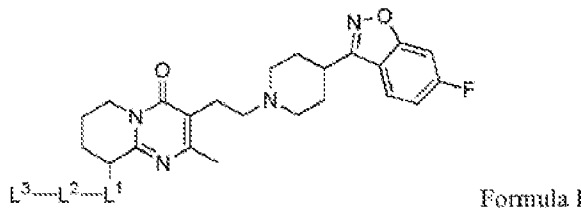
La paliperidona es:



**RESUMEN DE LA INVENCION**

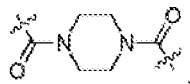
La presente invención proporciona compuestos y conjugados como se define en las reivindicaciones que permiten un método mejorado de este tipo para la determinación de los niveles de la droga antipsicótica paliperidona.

La invención comprende compuestos de Fórmula I

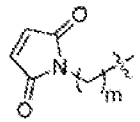


en donde

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>), o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>; en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC (O),

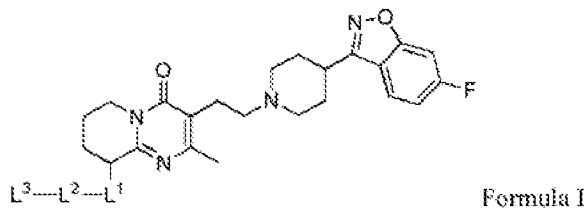


o ausente;  
L<sup>3</sup> es



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

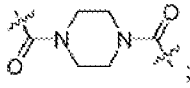
La invención comprende además compuestos de Fórmula I



en donde

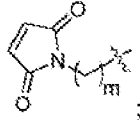
L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>), o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC (O), o

5



L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o

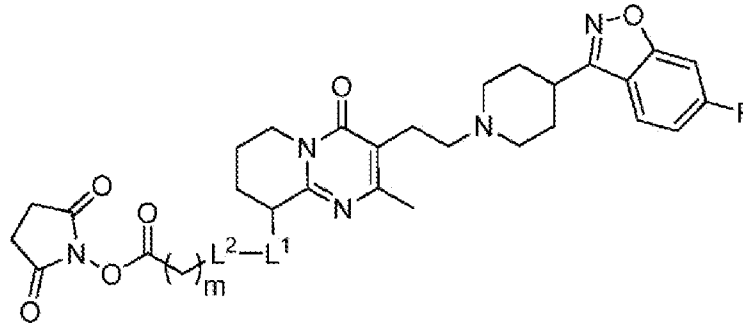
10



15 en donde m es 1, 2 o 3,

La invención también comprende un compuesto que es:

20



25

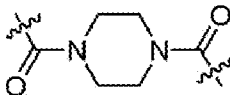
30

en donde

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>), o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 1, 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC (O),

35

40



; y  
 m es 0, 1, 2 o 3.

45

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

50 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

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

55

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

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

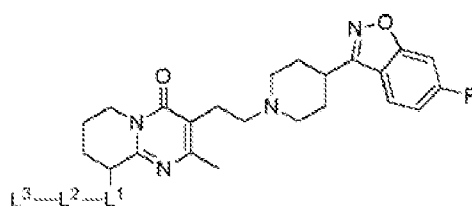
60

65

optimizar su régimen de tratamiento.

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

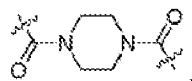
La invención comprende compuestos de Fórmula I



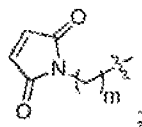
Fórmula I

en donde

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),



o está ausente;  
L<sup>3</sup> es



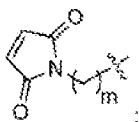
en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente.

En otra realización de la invención:

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),



L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o

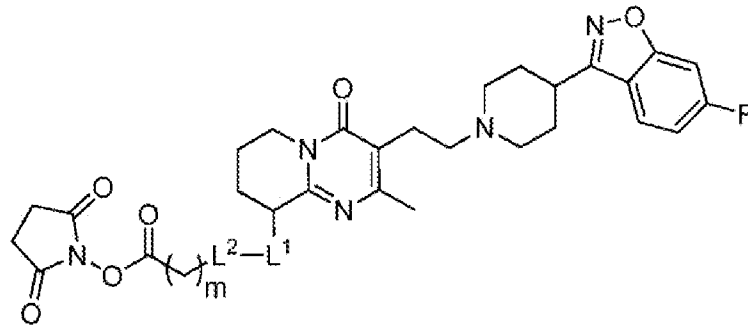


en donde m es 1, 2 o 3.

Otra realización de la invención comprende un compuesto que es:

5

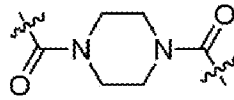
10



15

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

20

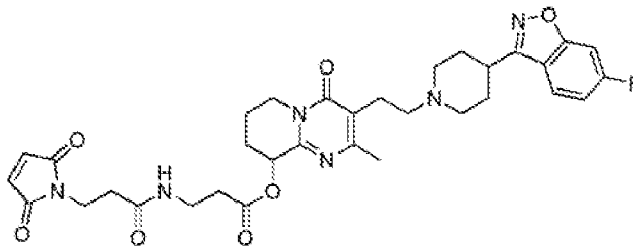


25

; y  
 $m$  es 0, 1, 2 o 3.

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

30

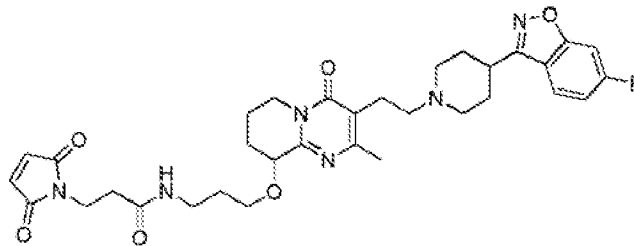


35

40

o

45



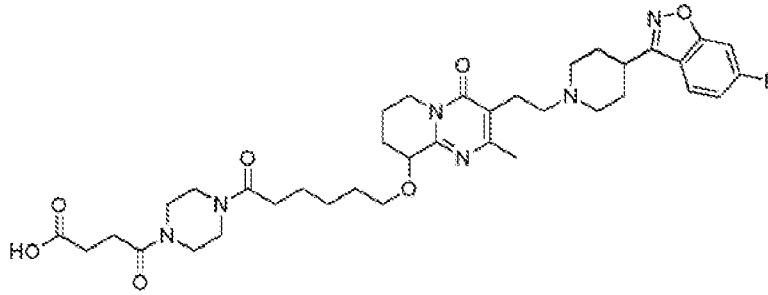
50

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

55

5

10

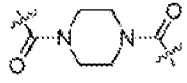


Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto de Fórmula I en la que

15

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

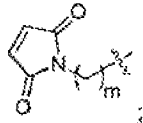
20



o está ausente;  
 L<sup>3</sup> es

25

30



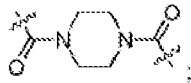
en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo puede ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente; y un portador inmunogénico.

35

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

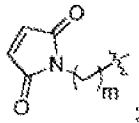
40

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O), o



45

L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o



50

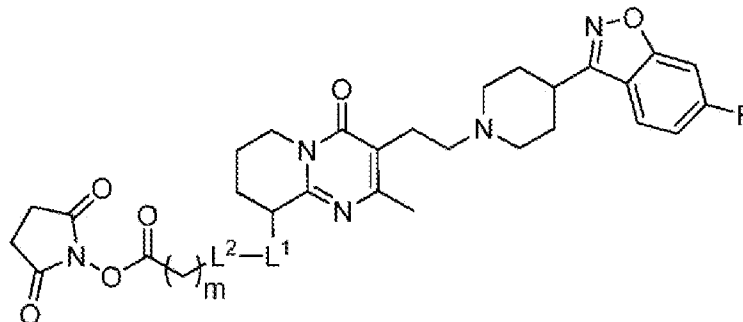
en donde m es 0, 1, 2 o 3; y un portador inmunogénico.

Otra realización de la invención es un conjugado del compuesto:

55

60

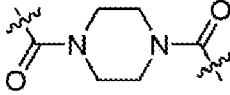
65



en donde

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 1, 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

5



10

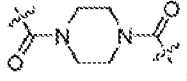
; y  
 m es 0, 1, 2 o 3. y un portador inmunogénico.

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

15

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2, o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

20

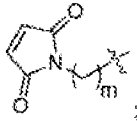


o está ausente;

25

L<sup>3</sup> es

30



35

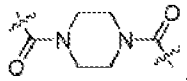
en donde m es 0, 1 o 2; siempre que m solo pueda ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente; y un portador inmunogénico.

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

40

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

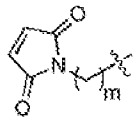
45



o está ausente;

50

L<sup>3</sup> es



55

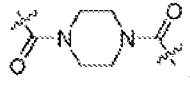
en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente; y una proteína

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

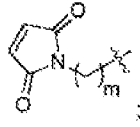
60

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

65



5 L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o



10

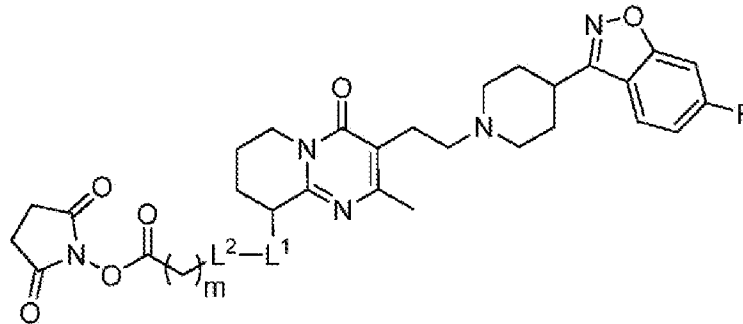
en donde m es 1, 2 o 3; y una proteína.

Otra realización de la invención es un conjugado del compuesto:

15

20

25

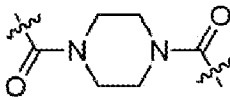


30

en donde

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>), o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 1, 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),

35



40

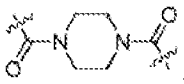
; y  
m es 0, 1, 2 o 3; y una proteína.

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

45

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>), o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),

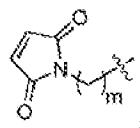
50



o está ausente;

55

L<sup>3</sup> es



60

en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo pueda ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente; y una proteína en la que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovoalbúmina.

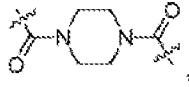
65

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

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;

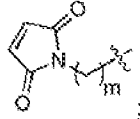
en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),

5



L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o

10



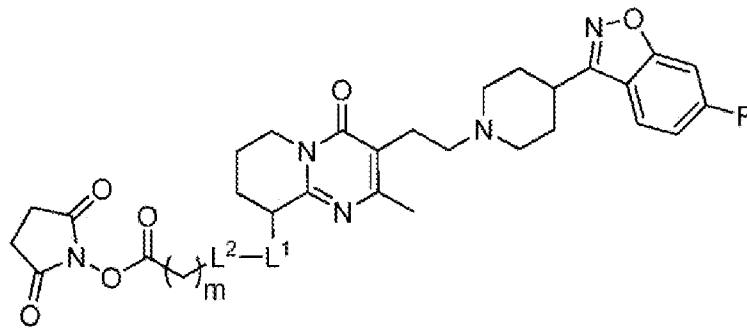
15 en donde m es 1, 2 o 3; y una proteína en la que la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovoalbúmina.

Otra realización de la invención es un conjugado del compuesto:

20

25

30

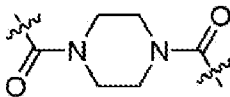


en donde

35

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 1, 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),

40



; y

45

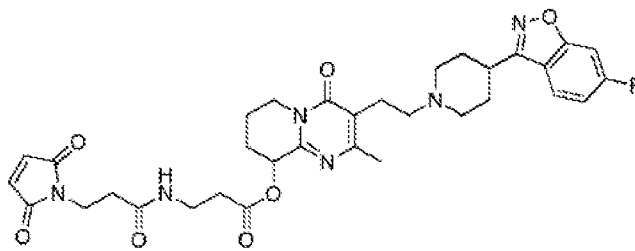
m es 0, 1, 2 o 3; y una proteína en donde la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovoalbúmina.

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

50

55

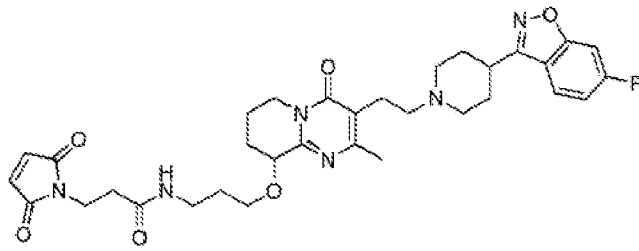
60



y

65

5



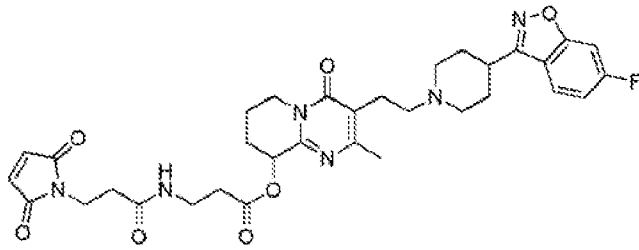
10

y un portador inmunogénico.

15

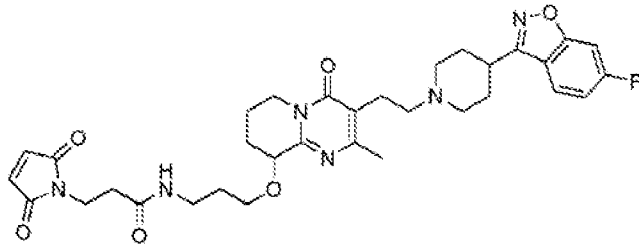
Otra realización de la invención es un conjugado de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

20



25 y

30



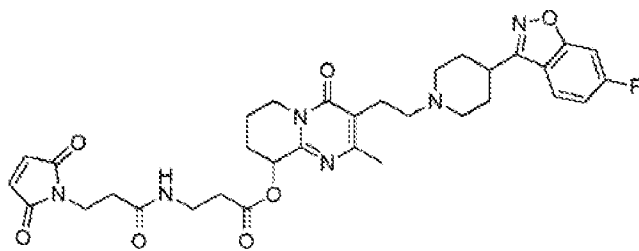
35

y una proteína.

40

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

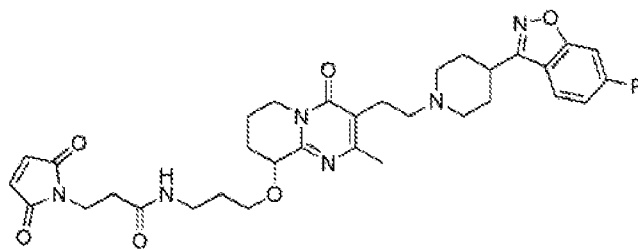
45



50

y

55

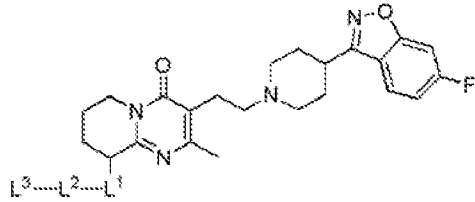


60

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

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

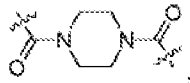
Otra realización de la invención es así un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un



Formula I

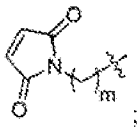
en donde:

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),



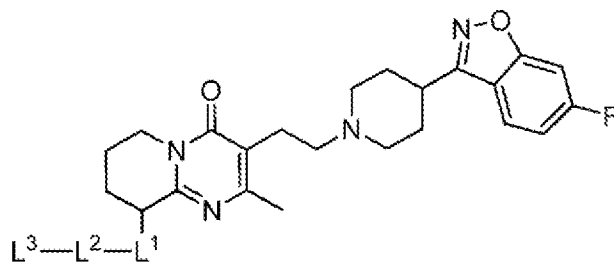
o está ausente;

L<sup>3</sup> es



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

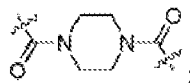
Otra realización de la invención es un producto hecho por el procedimiento anterior de poner en contacto un



Formula I

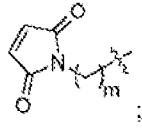
en donde:

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),



L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o

5

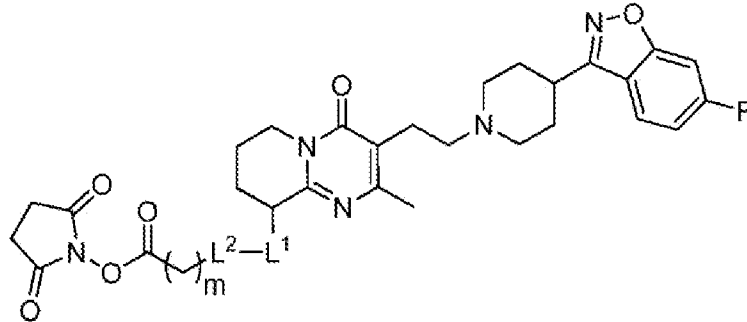


en donde m es 1, 2 o 3; con un portador inmunogénico.

10

Otra realización de la invención es por tanto un producto fabricado por el proceso de poner en contacto el compuesto:

15

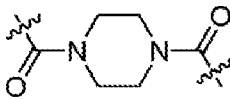


20

25 en donde

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 1, 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

30



35

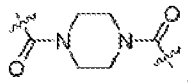
; y m es 0, 1, 2 o 3; con un portador inmunogénico.

40

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

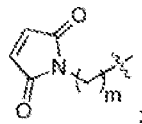
L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2, o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

45



50 o está ausente;  
 L<sup>3</sup> es

55



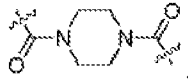
en donde m es 0, 1 o 2; siempre que m solo pueda ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente; con una proteína

60

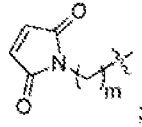
Otra realización de la invención es por tanto un producto fabricado por el procedimiento de poner en contacto un compuesto de fórmula I en donde:

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2, o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

65

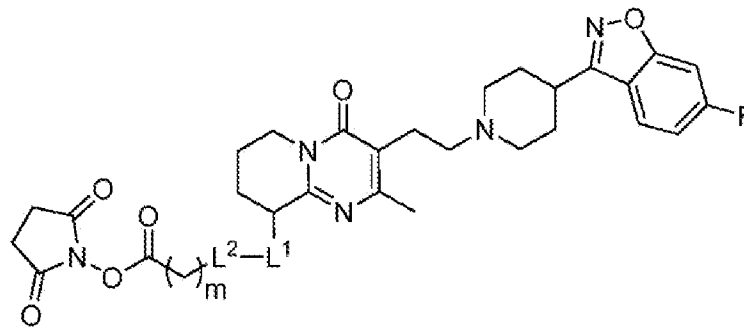


5 L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o



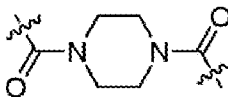
10 en donde m es 1, 2 o 3; con una proteína

15 Otra realización de la invención es por tanto un producto fabricado por el proceso de poner en contacto el compuesto:



20 en donde

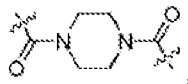
25 L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 1, 2 o 3;  
 30 L<sup>2</sup> es NHC(O),



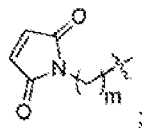
35 ; y  
 m es 0, 1, 2 o 3; con una proteína.

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

45 L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2, o 3;  
 50 L<sup>2</sup> es NHC(O),



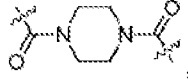
55 o está ausente  
 L<sup>3</sup> es



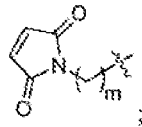
60 en donde m es 0, 1, 2 o 3; siempre que m solo puede ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente; con una proteína en donde la proteína  
 65 es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovoalbúmina.

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

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 2, o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),

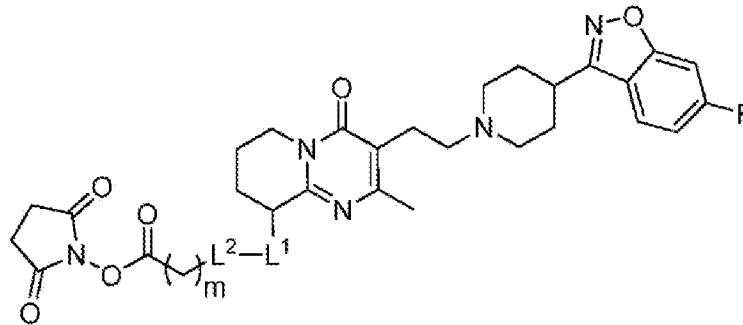


L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o



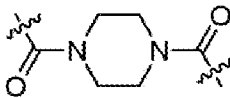
en donde m es 1, 2 o 3; con una proteína en donde la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina, u ovoalbúmina.

Otra realización de la invención es por tanto un producto fabricado por el proceso de poner en contacto el compuesto:



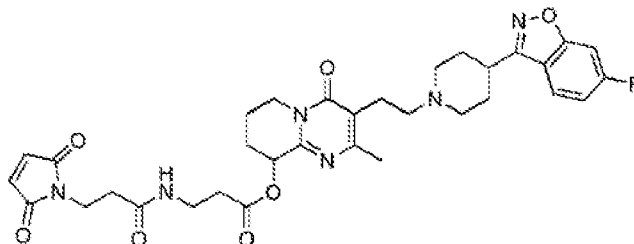
en donde

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
 en donde n es 1, 2 o 3;  
 L<sup>2</sup> es NHC(O),



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

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



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



**ABREVIATURAS**

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

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

**DEFINICIONES**

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

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

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

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

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

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

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

65

El vehículo inmunogénico también puede incluir partículas sólidas. Las partículas son generalmente de al menos aproximadamente 0,02 micras. ( $\mu\text{m}$ ) y no más de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , y generalmente de aproximadamente 0,05  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, óptimamente de una densidad de agua aproximada, generalmente de aproximadamente 0,7 a 1,5 g/ml, y compuesto de material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos, como células y microorganismos, incluidos ejemplos no limitativos, como eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, estafilococos aureus, E. coli y virus.

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

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

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

Un "marcador", "molécula detectora," o "reportero" es cualquier molécula que produce o puede ser inducida a producir una señal detectable. La etiqueta puede conjugarse con un analito, inmunógeno, anticuerpo o con otra molécula, como un receptor o una molécula que puede unirse a un receptor como un ligando, particularmente un hapteno o un anticuerpo. Ejemplos no limitantes de etiquetas incluyen isótopos radiactivos (p.ej., 125I), enzimas (p.ej.,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa), fragmentos de enzima, sustratos de enzimas, inhibidores de enzimas, coenzimas, catalizadores, fluoróforos (p.ej., rodamina, isotiocianato de fluoresceína o FITC, o Dylight 649), colorantes, quimioluminiscentes y luminiscentes (p.ej., dioxetanos, luciferina) o sensibilizadores.

Como se usa en este documento, un "espaciador" se refiere a una porción de una estructura química que conecta dos o más subestructuras como haptenos, portadores, inmunógenos, etiquetas o parejas de unión a través de un grupo de enlace funcional. Estos grupos espaciadores se componen de los átomos que suelen estar presentes y se ensamblan de manera que se encuentran típicamente en compuestos orgánicos y pueden denominarse "grupos de espaciado orgánico". Los bloques de construcción químicos utilizados para ensamblar los espaciadores serán descritos más adelante en esta solicitud. Entre los espaciadores preferidos están las cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas. Estas cadenas de carbono también pueden incluir uno o más heteroátomos dentro de la cadena, uno o más heteroátomos reemplazando uno o más hidrógenos de cualquier átomo de carbono en la cadena, o en el extremo de las cadenas. Por "heteroátomos" se quiere decir átomos distintos al carbono que se eligen del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, en donde los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación y pueden tener carbono u otros heteroátomos unidos a ellos. El espaciador también puede incluir grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como sustitución en uno de los átomos de la cadena.

El número de átomos en el grupo espaciador se determina contando los átomos distintos de hidrógeno. El número de átomos en una cadena dentro de un grupo espaciador se determina contando el número de átomos que no sean hidrógeno a lo largo de la ruta más corta entre las subestructuras conectadas. Las longitudes de cadena preferidas son entre 1 y 20 átomos.

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

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

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

El término "sustituido" se refiere a la sustitución de un átomo o grupo de átomos en lugar de un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono en cualquier posición sobre la molécula parental. Ejemplos no limitantes de

sustituyentes incluyen átomos de halógeno, amino, grupos hidroxilo, carboxi, alquilo, arilo, heteroalquilo, heteroarilo, ciano, alcoxi, nitro, aldehído y cetona.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 El término "carboxialquilo" se refiere a al menos un grupo carboxilato unido a cualquier átomo de carbono a lo largo de una cadena de alquilo. El término "grupo carboxilato" incluye ácidos carboxílicos y ésteres de carboxilato de alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo.

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

55 El término "heteroarilo" se refiere a radicales de anillo aromático monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 8 a 10 miembros, pudiendo consistir cualquier anillo de los cuales de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O o S donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden existir en cualquier estado de oxidación permitido. Los ejemplos incluyen benzimidazolilo, benzotiazolilo, benzotienilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, pirazinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolinilo, tiazolilo y tienilo.

60 El término "heteroalquilo" se refiere a un grupo C<sub>1-6</sub> alquilo que tiene un sustituyente heteroarilo. Los ejemplos incluyen furiletilo y 2-quinolinilpropilo.

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

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

El término "aralquilo" se refiere a un grupo C<sub>1-6</sub> alquilo que contiene un sustituyente arilo. Los ejemplos incluyen bencilo, feniletilo o 2-naftilmetilo.

El término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo C<sub>1-6</sub> alquilo que contiene un sustituyente heteroarilo. Ejemplos incluyen furilmetilo y piridilpropilo.

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

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

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

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

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

Para haptenos que llevan un grupo amino, modos de unión del espaciador al hapteno incluyen la reacción de la amina en el hapteno con un bloque de construcción espaciador que contiene un haluro de acilo o éster activo. Los "ésteres activos" se definen como ésteres que experimentan reacción con un grupo nucleofílico, por ejemplo, un grupo amino, en condiciones suaves para formar un enlace estable. Un enlace estable se define como uno que permanece intacto en condiciones de uso adicional, por ejemplo, pasos sintéticos posteriores, uso como un inmunógeno, o en un ensayo bioquímico. Un ejemplo preferido de un enlace estable es un enlace amida. Los ésteres activos y los métodos de formación se describen en Benoiton, NL, en Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*, Thieme Stuttgart, Nueva York, vol. E22, sección 3.2: 443 y Benoiton, NL, *Chemistry of Peptide Synthesis*, Taylor and Francis, NY, 2006. Los ésteres activos preferidos incluyen el éster p-nitrofenílico (PNP), la N-hidroxisuccinimida éster (NHS) y éster tetrafluorofenílico (TFP). Los haluros de acilo se pueden preparar por muchos métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, reacción del ácido carboxílico con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, ver: Fieser, LF y Fieser, M. *Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, NY, 1967 y referencias dentro. Estos pueden ser convertidos a otros ésteres activos, como los ésteres de p-nitrofenilo (PNP), que también se pueden usar en espaciadores bifuncionales activos según lo descrito por Wu et.al, *Organic Letters*, 2004, 6 (24): 4407. Los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) pueden ser preparados por reacción de carbonato de N,N-disuccinimidilo (CAS 74124-79-1) con el ácido carboxílico de un compuesto en la presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiltilamina en un disolvente aprótico en condiciones anhidras como se describe en el ejemplo 35 del documento WO2012012595 o usando N-hidroxisuccinimida y dicitohexilcarbodiimida (DCC) u otro agente deshidratante, en condiciones anhidras. Los ésteres tetrafluorofenílicos (TFP) pueden prepararse mediante la reacción de ácidos carboxílicos con 2,3,5,6-tetrafluorofeniltrifluoroacetato en presencia de una base orgánica como trietilamina o diisopropiltilamina en un disolvente aprótico en condiciones anhidras según lo informado por Wilbur, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2004, 15 (1): 203. Un experto en la materia reconocerá que los espaciadores mostrados en la Tabla 1, entre otros, se puede obtener usando métodos conocidos y se puede unir a haptenos portadores de aminoácidos utilizando la optimización de condiciones de reacción. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol en un portador.

5

Tabla 1

10

15

20

25

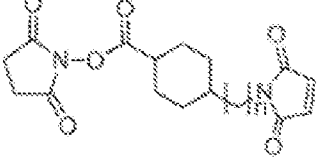
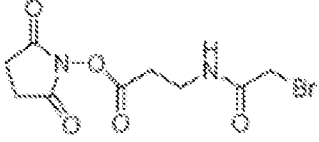
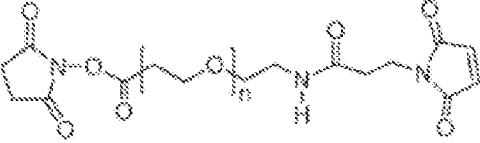
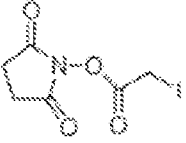
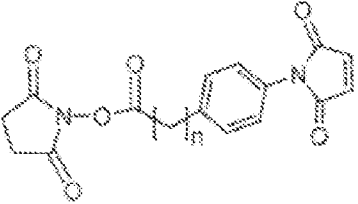
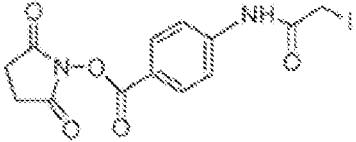
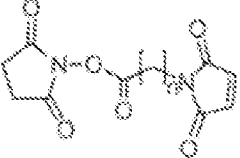
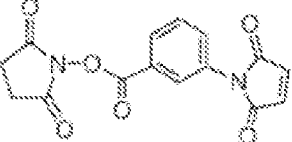
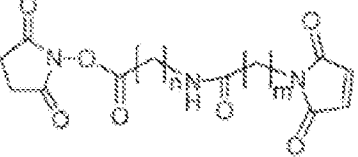
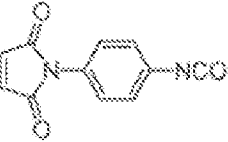
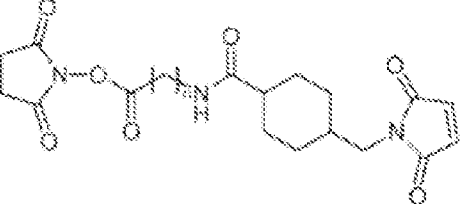
30

35

40

45

50

	
	
	
	
	
	Valores razonables para m y n están entre 1 y 10

55

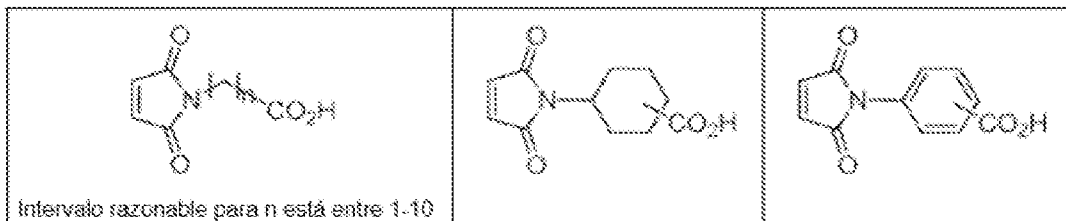
60

65

El acoplamiento directo de la amina en el hapteno y una funcionalidad de ácido carboxílico en el bloque de construcción espaciador en la presencia de un agente de acoplamiento también se puede utilizar como un modo de unión. Los reactivos preferidos son aquellos que se usan típicamente en la síntesis de péptidos. Los reactivos de acoplamiento de péptidos incluyen, entre otros, tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU, CAS N° 125700-67-6), ver: Pruhs, S., Org. Proceso. Res. Dev. 2006, 10: 441; N-hidroxibenzotriazol (HOBT, CAS N° 2592-95-2) con un agente deshidratante carbodiimida, por ejemplo, N-N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), o 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidehidrocloruro (EDC), ver: König W., Geiger, R. Chem. Ber., 1970, 103 (3): 788; 3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (DEPBT, CAS N° 165534-43-0), ver: Liu, H. et al., Chinese Chemical Letters, 2002, 13 (7): 601; Cloruro de Bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico; (BOP-C1, CAS N° 68641-49-6), ver: Diago-Meseguer, J et.al. Synthesis, 1980, 7: 547-51 y otros descritos en detalle por Benoiton in Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005, Capítulo 2, y el boletín técnico proporcionado por **Tecnologías avanzadas de proteínas peptídicas automatizadas (aapptec)**, 6309 Shepardsville Rd., Louisville KY 40228, ph 888 692 9111; [www.aapptec.com](http://www.aapptec.com), y referencias dentro. Estos métodos crean un enlace de amida estable que une el hapteno al espaciador. Se muestran ejemplos de espaciadores que se pueden obtener usando métodos conocidos y se enlazan a haptenos que contienen amino utilizando la optimización de rutina de las

condiciones de reacción que emplean los métodos descritos y citados anteriormente, pero no se limitan a los de la Tabla 2. Estos espaciadores permiten la unión del hapteno a un grupo tiol sobre un portador.

Tabla 2



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

Además, cuando el hapteno tiene un grupo nucleófilo, por ejemplo, un grupo tiol, un grupo amino o un grupo hidroxilo del grupo que se convertirá en el punto de unión del separador, el separador también puede ser construido por alquilación del tiol, amina o grupo hidroxilo. Cualquier grupo alquilo que esté apropiadamente sustituido con un resto capaz de sufrir una reacción de sustitución, por ejemplo, un haluro de alquilo o un éster de ácido sulfónico tal como p-toluensulfonato, se puede usar para colocar el espaciador. Un experto en la técnica conoce muchos ejemplos de reacciones de alquilación y pueden encontrarse ejemplos específicos en la literatura química general y optimizados mediante experimentación de rutina. Una discusión de las reacciones de alquilación con muchas referencias se puede encontrar en el Capítulo 10 de March's Advanced Organic Chemistry, Smith, MB, y March, J., John Wiley & sons, Inc. NY, 2001. También se pueden emplear otros enlaces, como la reacción del resto nucleófilo, por ejemplo, una amina, en el hapteno con un isocianato para formar una urea o una reacción con un isotiocianato para formar un enlace de tiourea, ver: Li, Z., et al., Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements, 2003, 173 (2): 293-297. Los espaciadores pueden unirse a haptenos que llevan grupos hidroxilo por reacción con grupos isocianato para formar enlaces carbamato o uretano. El espaciador puede activarse diferencialmente con el grupo funcional isocianato en un extremo y un grupo de enlace funcional capaz de reaccionar con el vehículo, ver: Annunziato, ME, Patel, U.S., Ranade, M. y Palumbo, PS, Bioconjugate Chem., 1993, 4: 212-218.

Para haptenos que llevan un grupo ácido carboxílico, modos de unión de una porción espaciadora para el hapteno incluyen la activación del grupo de ácido carboxílico como un haluro de acilo o éster activo, ejemplos de los cuales se muestran en la Tabla 3, la preparación de los cuales se describen anteriormente, seguido de la reacción con un amino (-NH<sub>2</sub>), hidrazino (-NH-NH<sub>2</sub>), hidrazido (-C(O)-NH-NH<sub>2</sub>-) o grupo hidroxilo (-OH) en la porción espaciadora para formar un enlace amida, hidrazida, diacilhidracina o éster, o acoplamiento directo del grupo ácido carboxílico con un grupo amino en la porción espaciadora o directamente en el portador con un reactivo de acoplamiento peptídico y/o reactivo deshidratante de carbodiimida, descritos anteriormente, cuyos ejemplos se muestran en las Tablas 4 y 5. Los procedimientos encontrados en las referencias citadas anteriormente para la formación de ésteres activados y el uso de agentes de acoplamiento peptídicos puede emplearse para la unión de haptenos que contienen ácido carboxílico a los bloques de construcción espaciadores y portadores de proteínas con grupos amino disponibles que utilizan la optimización de rutina de las condiciones de reacción.

Tabla 3

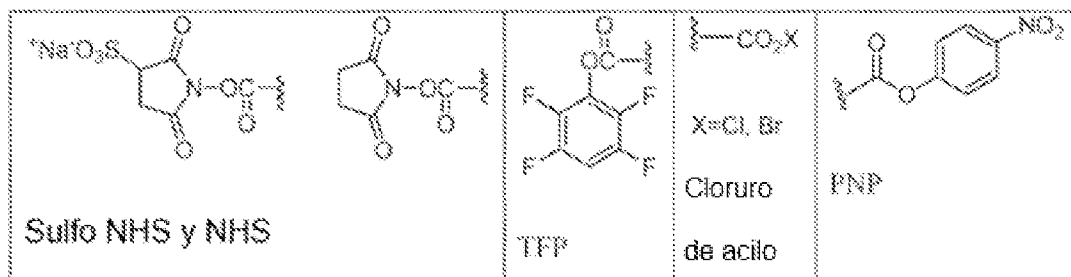


Tabla 4

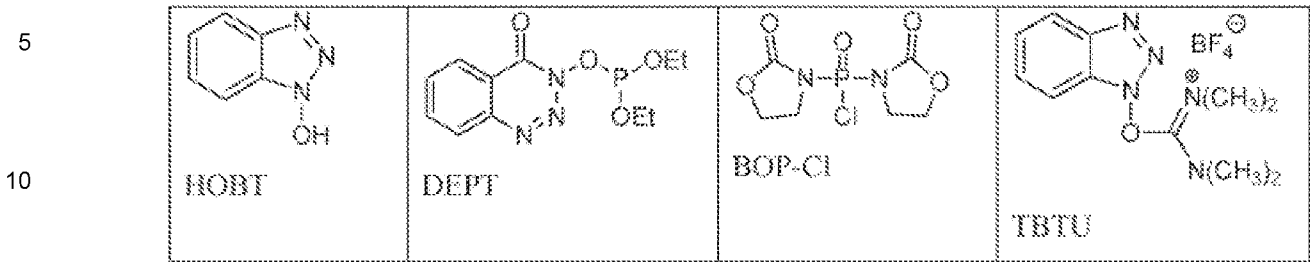
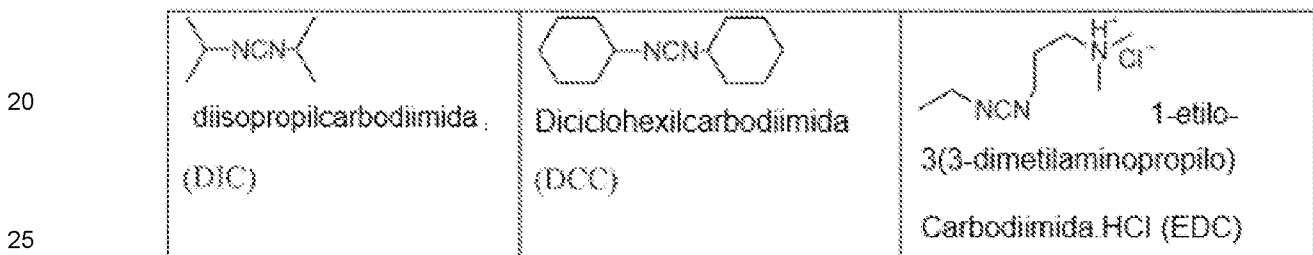


Tabla 5



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



o un grupo de fósforo electrófilo, por ejemplo:



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

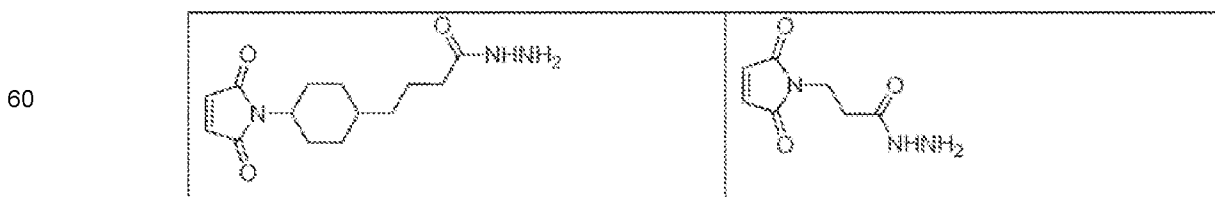


R<sub>c</sub> es alquilo, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo.

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

50 Los haptenos que llevan grupos aldehído o cetona pueden unirse a los espaciadores utilizando métodos que incluyen, entre otros, la reacción con un grupo de hidrazida H<sub>2</sub>N-NH-C(O)-en el espaciador para formar una acilhidrazona, ver: Chamow, SM, Kogan, TP, Peers, DH, Hastings, RC, Byrn, RA y Askenaszi, A., J. Biol. Chem., 1992, 267 (22): 15916. Los ejemplos de grupos espaciadores de hidrazida bifuncionales que permiten la unión a un grupo tiol en el portador se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6



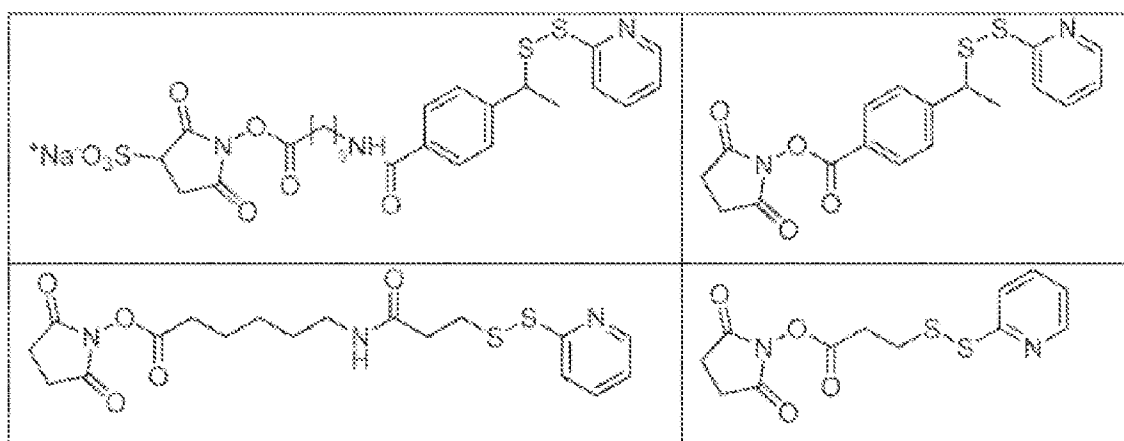
65 Los haptenos también pueden contener grupos tiol que pueden reaccionar con el vehículo siempre que el vehículo se haya modificado para proporcionar un grupo que pueda reaccionar con el tiol. Los grupos portadores

pueden modificarse mediante métodos que incluyen, entre otros, la unión de un grupo que contiene un grupo funcional maleimida mediante la reacción de un grupo amino en el vehículo con maleimidoacetato de N-succinimidilo, (AMAS, CAS N° 55750-61-3), yodoacetato de succinimidilo (CAS N° 151199-81-4), o cualquiera de los grupos espaciadores bifuncionales mostrados en la Tabla 1 para introducir un grupo que puede sufrir una reacción que provoque la unión del hapteno al portador.

El grupo de unión funcional capaz de formar un enlace con el portador puede ser cualquier grupo capaz de formar un enlace estable y puede ser reactivo a varios grupos diferentes en el portador. El grupo de enlace funcional puede reaccionar preferiblemente con un grupo amino, un grupo ácido carboxílico o un grupo tiol en el vehículo, o un derivado del mismo. Ejemplos no limitativos del grupo de enlace funcional son un grupo ácido carboxílico, haluro de acilo, éster activo (como se definió anteriormente), isocianato, isotiocianato, haluro de alquilo, grupo amino, grupo tiol, grupo maleimida, grupo acrilato ( $H_2C=CHC(O)-$ ) o grupo de vinil sulfona  $H_2C=CH-SO_2-$  Ver: Park, JW, et al., Bioconjugate Chem., 2012, 23 (3): 350. el grupo de enlace puede estar presente como parte de un bloque de construcción espaciador activado de forma diferencial que puede hacerse reaccionar gradualmente con el hapteno y el derivado de hapteno resultante puede hacerse reaccionar con el portador. Alternativamente, el hapteno se puede derivar con un espaciador que lleva un grupo precursor que puede transformarse en el grupo de enlace funcional mediante una reacción posterior. Cuando el grupo de enlace funcional en el espaciador es una amina o un grupo ácido carboxílico, la reacción de acoplamiento con el grupo ácido carboxílico o la amina en el vehículo se puede llevar a cabo directamente mediante el uso de reactivos de acoplamiento peptídicos de acuerdo con los procedimientos en las referencias citadas anteriormente para estos reactivos.

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

Tabla 7

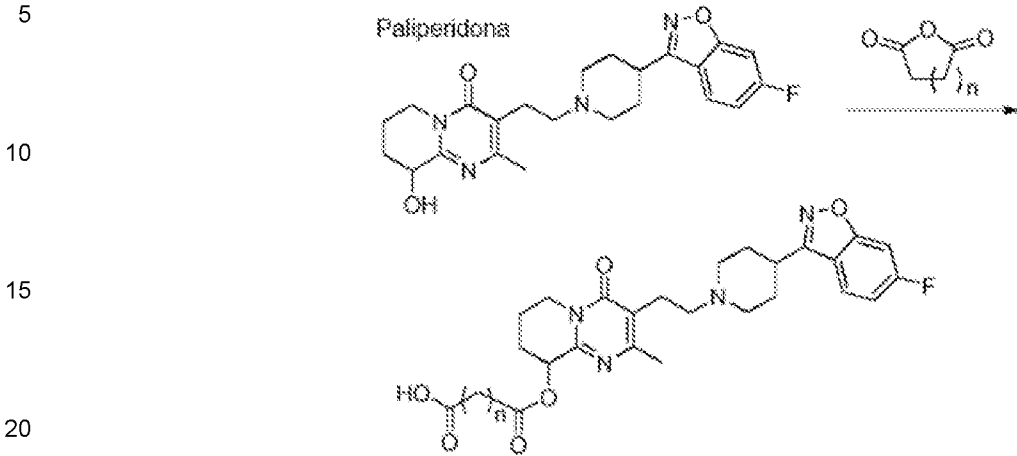


Más frecuentemente el portador es una proteína y los grupos  $\alpha$ -amino de los residuos de lisina pueden ser utilizados para la fijación, ya sea directamente por reacción con un grupo de unión funcional de amina reactiva o después de la derivatización con una que contiene grupo tiol, incluyendo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

## ESQUEMAS GENERALES DE REACCIÓN

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

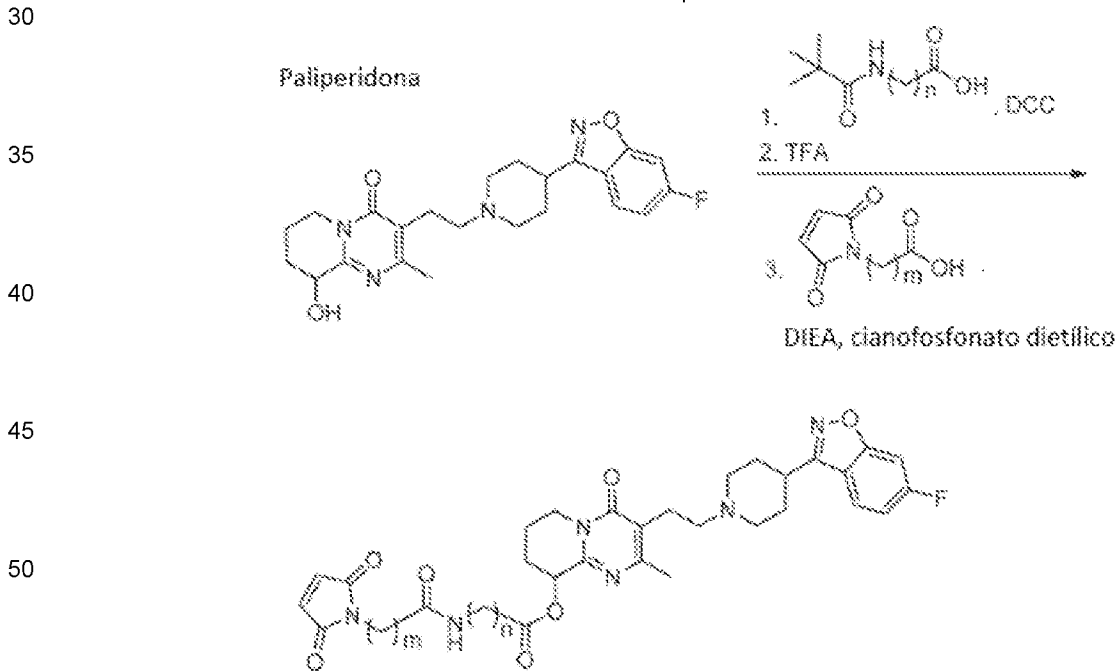
Esquema 1 (proporcionado para ayudar con la síntesis de los compuestos reivindicados, por ejemplo, los del Esquema 2)



25

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

Esquema 2



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



65

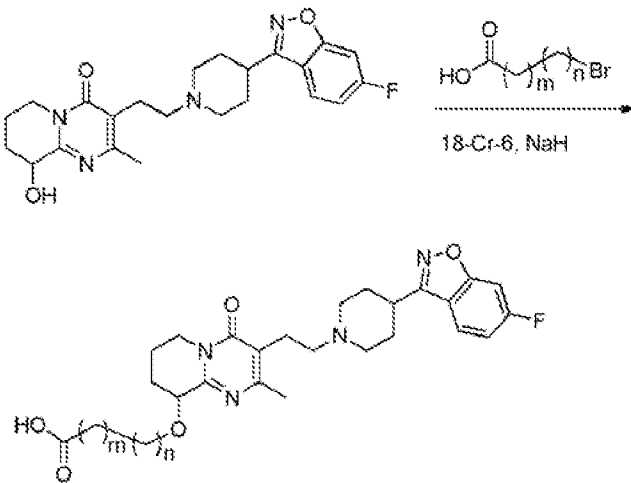
se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 2. La condensación de un aminoácido protegido de boc adecuado, tal como la glicina, con paliperidona, se logra utilizando un agente deshidratante como la dicitohexilcarbodiimida. La reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico, como el diclorometano, a temperatura ambiente, utilizando una base como la *N,N*-dimetil-4-piridinamina. La desprotección del grupo amina procede con ácido trifluoroacético,

fluyendo mediante la posterior adición de la funcionalidad de maleimida. La maleimida puede introducirse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la reacción con un aminoácido de alquilo sustituido con *N*-maloil (como se muestra en el esquema 2) en un disolvente como el diclorometano y reactivos de acoplamiento como la diisopropiltilamina y el cianofosfonato de dietilo proporciona el enlazador funcionalizado con maleimida en el hapteno. Alternativamente, se pueden usar otros grupos de funcionalización con maleimida, como el 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)acetato, en un solvente como DMF y bases., como la tributilamina.

Los procedimientos del Esquema 2 también pueden utilizarse para los compuestos de Fórmula I donde L<sup>1</sup> es O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>. La paliperidona, en cambio, reacciona con un bromuro de aminoalquilo protegido con boc apropiado (como el bromuro de boc-aminopropilo), 18-Corona-6 e hidruro de sodio, en un disolvente como THF, a aproximadamente la temperatura ambiente, durante aproximadamente 6 horas. La eliminación posterior del grupo protector de boc y la instalación de la funcionalidad de maleimida proceden como se describe en el Esquema 2.

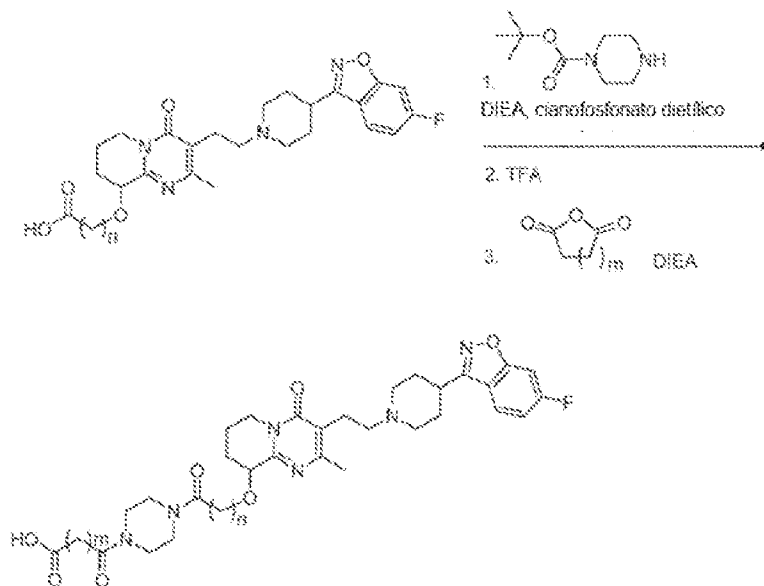
Esquema 3 (proporcionado para ayudar con la síntesis de los compuestos reivindicados, por ejemplo, los del Esquema 4)

Paliperidona

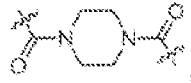


La paliperidona puede hacerse reaccionar con un bromuro de alquilo sustituido con CO<sub>2</sub>H en un disolvente, tal como THF, en presencia de 18-Corona-6 e hidruro de sodio, durante aproximadamente 18 h.

Esquema 4

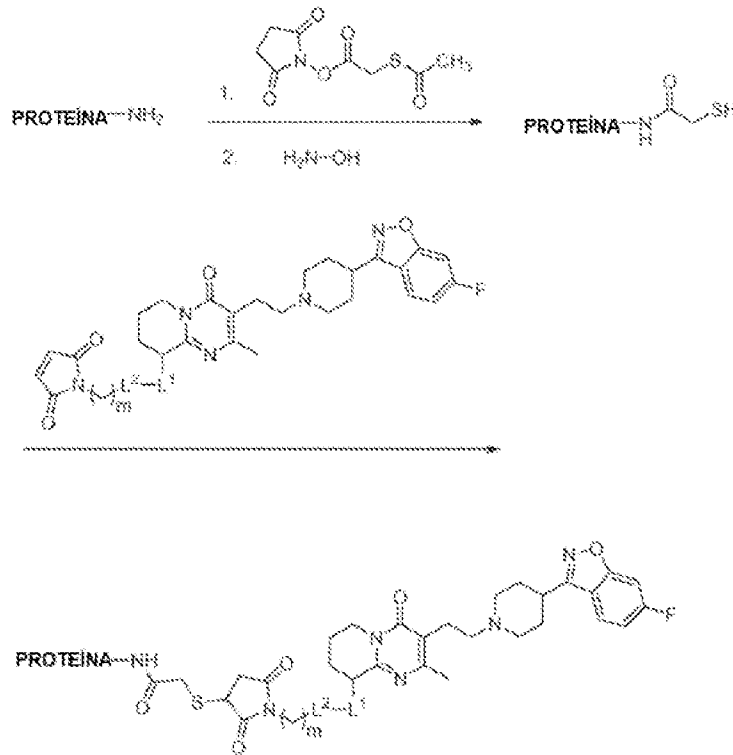


Compuestos de Fórmula I donde L<sup>1</sup> es O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, L<sup>2</sup> es



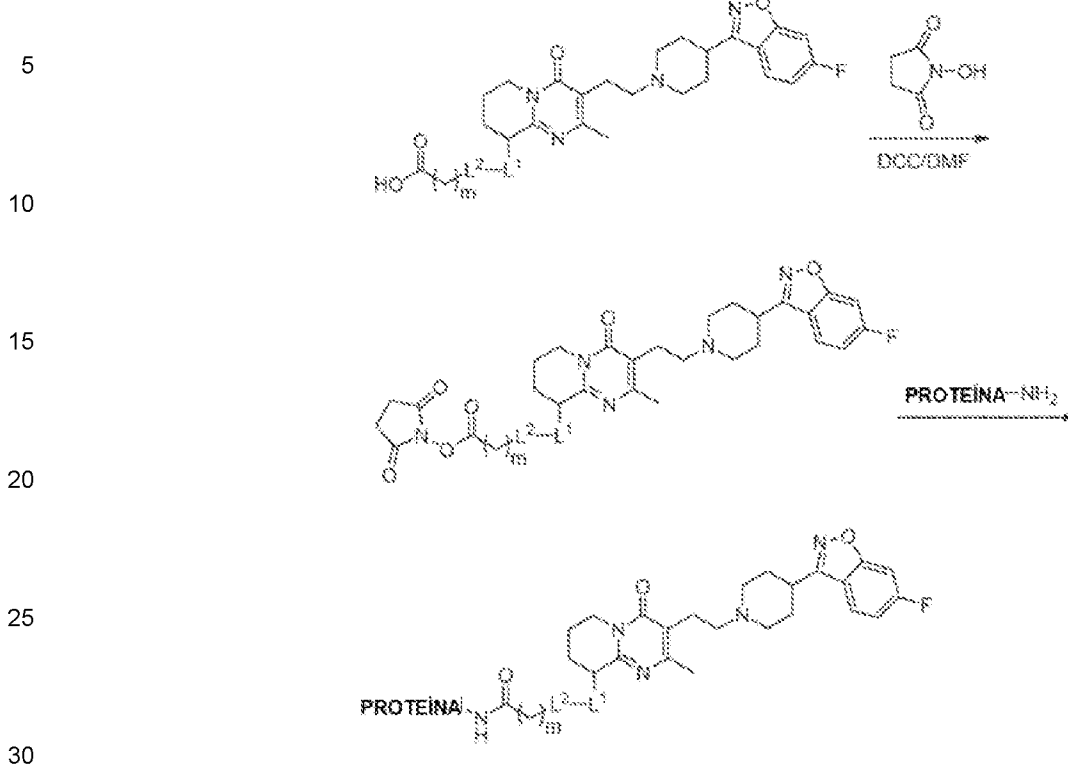
5 y L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H pueden prepararse de acuerdo con el Esquema 4. La paliperidona funcionalizada con un enlazador y CO<sub>2</sub>H, preparados como se describe en el esquema 3, se tratan con *N*-*t*-butoxicarbonilpiperazina, cianofosfonato dietílico y una base, tal como diisopropiletilamina. La reacción se lleva a cabo en diclorometano, durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La desprotección del grupo piperazinilo se realiza con anhídrido trifluoroacético como se describe en el Esquema 2, seguido de reacción con un anhídrido apropiado, tal como anhídrido succínico o anhídrido maleico, en presencia de una base adecuada tal como diisopropiletilamina. Alternativamente, un experto en la técnica reconocerá que el grupo piperazinilo desprotegido puede estar elaborado con una funcionalidad demmaleimida, tal como se describe en el Esquema 2.

Esquema 5



45 Los haptenos funcionalizados con maleimida se pueden conjugar con proteínas de acuerdo con el método mostrado en el Esquema 5. La activación de los residuos de lisina de proteína por acilación del épsilon-nitrógeno con *N*-succinimidil *S*-acetiltioacetato (SATA) seguido de la posterior hidrólisis del grupo *S*-acetilo con hidroxilamina produce un grupo sulfhidrilo nucleófilo. La conjugación de la proteína activada con sulfhidrilo con el hapteno derivado de maleimida (preparado como se describe en general Esquema 2) procede a través de una reacción de adición de Michael. Las proteínas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina y ovoalbúmina.

Esquema 6:



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

40 **PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS**

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

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

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

Los procedimientos para producir tales anticuerpos comprenden inocular un huésped con el conjugado (el compuesto y el portador inmunogénico que es un inmunógeno) que incorpora características de la presente invención. Los huéspedes adecuados incluyen, entre otros, ratones, ratas, hámsters, cobayas, conejos, pollos, burros, caballos, monos, chimpancés, orangutanes, gorilas, humanos y cualquier especie capaz de desarrollar una respuesta inmune madura. Los procedimientos de inmunización están bien establecidos en la técnica y se exponen en numerosos tratados y publicaciones que incluyen "The Immunoassay Handbook", 2ª edición, editado por David Wild (Nature Publishing Group, 2000) y las referencias citadas en el mismo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## INMUNOENSAYOS

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

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

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

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

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

## EJEMPLOS

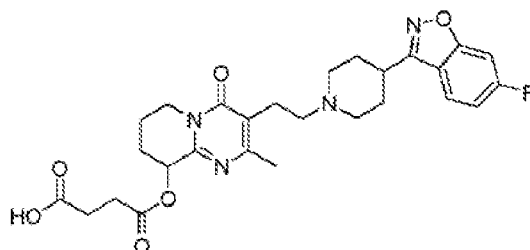
Los compuestos representativos de la presente invención se pueden sintetizar de acuerdo con los métodos generales sintéticos descritos a continuación. Los compuestos de Fórmula (I) se pueden preparar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los siguientes ejemplos solo pretenden representar ejemplos de la invención

y de ninguna manera pretenden ser un límite de la invención.

Ejemplo 1 (no especificado en las reivindicaciones)

5 4-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etil)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)-4-ácido oxobutanoico

10



15

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

20

25

Ejemplo 2

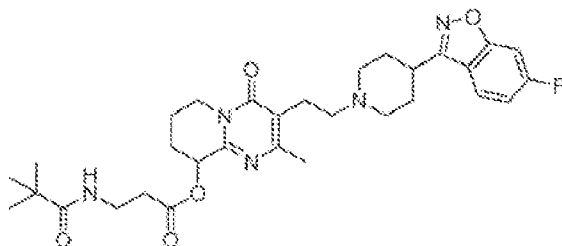
30

Paso A

35

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

40



45

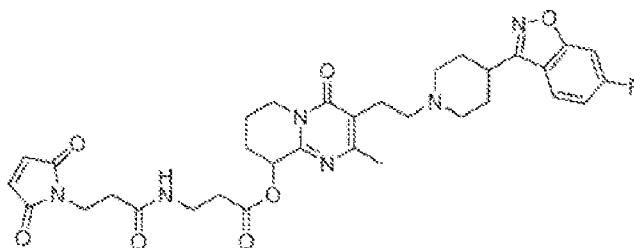
50

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

55

Paso B

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

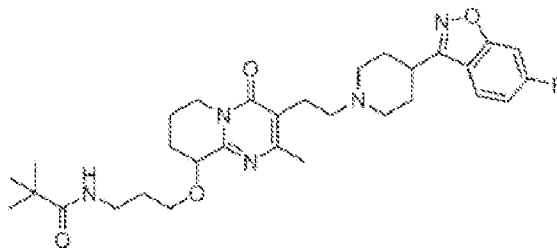


Una solución de 3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)piperidin-1-yl)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il 3-pivalamidopropanoato, preparado como se describe en el Paso A, (901,5 mg, 1,15 mmol) en diclorometano (20 ml) y ácido trifluoroacético (5,7 ml) se agitó durante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

### Ejemplo 3

#### Paso A

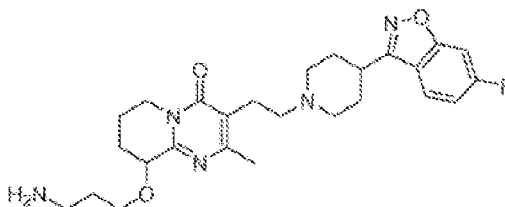
N-(3-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)piperidin-1-yl)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)propil)pivalamida



Una solución de paliperidona (746,26 mg, 1,75 mmol) en THF (15 ml) se trató con bromuro de 3-(Boc-amino)propilo (500 mg, 2,10 mmol), 18-Corona-6 (231,25 mg, 0,874 mmol) e hidruro de sodio (60% p/p, 139,97 mg, 3,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. El disolvente se eliminó al vacío, se disolvió en diclorometano/agua (50 ml/50 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (tres veces 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto del título, que se usó sin purificación adicional en el siguiente paso.

#### Paso B

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



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

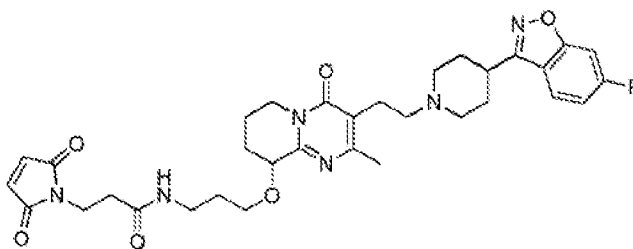
#### Paso C

3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-yl)-N-(3-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)piperidin-1-yl)etilo)-2-metil-4-oxo-

6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)propilo)propanamida

5

10



15

20

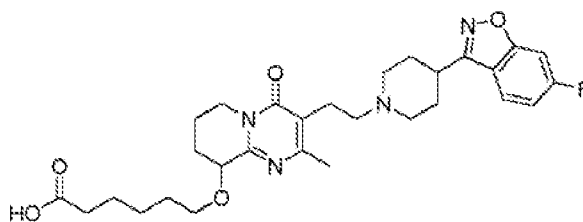
Una solución de 9-(3-aminopropoxi)-3-(2-(4-(6-fluorobenzofuroxan-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona, preparado como se describe en el Paso B, (0,303 g, 0,627 mmol) en diclorometano (5 ml), bajo argón, se trató con diisopropiltilamina (218,54  $\mu$ L, 1,25 mmol), *N*-maloil-3-ácido aminopropiónico (163,88 mg 0,940 mmol) y cianofosfonato de dietilo (159,19  $\mu$ L, 0,940 mmol). Después de 18 h, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (tres veces 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se concentraron. La mezcla bruta se purificó por HPLC para dar el compuesto del título. ESI-MS ( $M+1$ ) 635.

Ejemplo de 4 (no especificado en las reivindicaciones)

25

6-((3-(2-(4-(4-(6-fluorobenzofuroxan-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)ácido hexanoico

30



35

40

Una solución de paliperidona (1,0 g, 2,34 mmol) en THF (15 ml), en atmósfera de argón, se trató con 18-Corona-6 (309,88 mg, 1,17 mmol), acetato de 6-bromohexanoato (628,76  $\mu$ L, 3,52 mmol) e hidruro de sodio (60% p/p, 937,80 mg, 23,45 mmol). Después de 18 h, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (tres veces 20 ml). La capa acuosa se acidificó con ácido acético y se extrajo con 2-metil THF (tres veces 20 ml). Las capas de THF orgánicas de 2-metil combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC para dar el compuesto del título. ESI-MS ( $M+1$ ) 541.  $^1\text{H}$  RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz):  $\delta$  ppm 1,35-2,00 (m, 11H),  $\delta$  2,10 a 2,30 (m, 8H),  $\delta$  2,40-2,80 (m, 8H),  $\delta$  3,20- 4,00 (m, 5H),  $\delta$  4,24 a 4,30 (m, 1H),  $\delta$  7,07 (td,  $J = 8,97, 1,83$  Hz, 1H),  $\delta$  7,24 (d,  $J = 1,83$  Hz, 1H),  $\delta$  7,76 (dd,  $J = 8,60, 4,94$  Hz, 1H).

45

Ejemplo 5

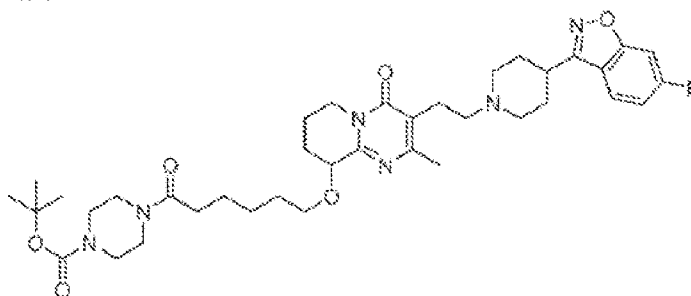
Paso A

50

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

55

60



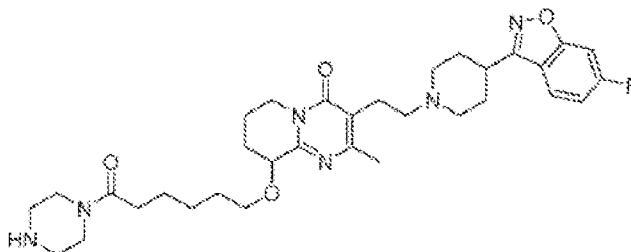
65

Una solución del Ejemplo 4 (200 mg, 0,37 mmol) en diclorometano (10 ml), en atmósfera de argón, se trató con *N*-*t*-butoxicarbonilpiperazina (89,57 mg, 0,48 mmol) y diisopropiltilamina (77,42  $\mu$ L, 0,44 mmol). A la solución en agitación, se le añadió cianofosfonato de dietilo (72,06  $\mu$ L, 0,43 mmol). Después de agitarse durante dos horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en agua (20 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano

(tres veces 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. Se utilizó la mezcla cruda sin más purificación en el siguiente paso. (408 mg, ESI-MS (M+1) 709)

#### Paso B

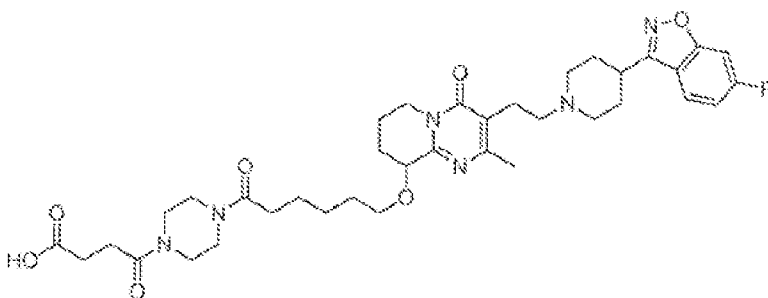
3-(2-(4-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-9-((6-oxo-6-(piperazin-1-il)hexil)oxi)-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona



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

#### Paso C

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



Una solución de 3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-9-((6-oxo-6-(piperazin-1-il)hexil)oxi)-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona, preparada como se describe en el Paso B, (239 mg, 0,39 mmol) en diclorometano (5 ml), bajo argón, se trató con anhídrido succínico (43,15 mg, 0,43 mmol) y diisopropilamina (68,35 µl, 0,39 mmol). Después de agitarse durante 2 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en agua (5 ml) y la capa acuosa se extrajo con diclorometano/metanol (95/5, tres veces 5 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC y se trituró con diisopropiléter, para dar el compuesto del título. (ESI-MS (M+1) 709); <sup>1</sup>H RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 360 MHz): δ ppm 1,10-2,80 (m, 31H), δ 3,20-4,00 (m, 13H), δ 4,24-4,30 (m, 1H), δ 7,07 (td, J = 8,97, 1,83 Hz, 1H), δ 7,24 (d, J = 1,83 Hz, 1H), δ 7,76 (dd, J = 8,60, 4,94 Hz, 1H)

#### Ejemplo 6

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

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

Al KLH-SH del Paso 1 (10,3 ml, 0,171  $\mu$ moles) se añadió 770  $\mu$ l de una solución de DMF de 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(3-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)propil)propanamida (preparada como se describe en el Ejemplo 3, 10 mg/ml, 12,1  $\mu$ moles). La mezcla turbia resultante se incubó durante 4 horas a 20°C en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2  $\mu$ m, luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón de fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,46 M, a pH 7,4.

#### Ejemplo de referencia 7

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

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

#### Ejemplo 8

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

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

#### Ejemplo 9

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

Una solución de 4-(4-(6-((3-(2-(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)piperidin-1-il)etilo)-2-metil-4-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-9-il)oxi)hexanoil)piperazin-1-il)-4-oxobutanoico (preparado como se describe en el ejemplo 5, 17,1 mg, 24,1  $\mu$ moles), N-hidroxisuccinimida (NHS, 10,3 mg, 89,3  $\mu$ moles) y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 18,4 mg, 89,3  $\mu$ moles) en 600  $\mu$ l de DMF y 6  $\mu$ l de tributilamina se dejó en agitación durante 18 horas a 20°C. Una alícuota de 462  $\mu$ l (18,4  $\mu$ moles) de la solución resultante se añadió a 3,0 ml de una solución de tiroglobulina bovina (BTG 15,0 mg, 0,023  $\mu$ moles) en 100 mM de tampón fosfato pH 7,5. La mezcla turbia resultante se incubó a 20°C durante 2,5 horas en un mezclador de rodillos. La reacción se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45  $\mu$ m, luego se purificó en una columna Sephadex G-25 usando tampón fosfato 100 mM, cloruro de sodio 0,14 M, a pH 7,4.

#### Ejemplo 10

##### Inmunoensayo competitivo para paliperidona

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

Tabla 1

	Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
5		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
15		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Tabla 2

		Placa 1		
	Dilución	1	2	3
20	Puro		1C4	6E6
	Puro		2A5	7A7
25	Puro		2G10	
	Puro	Blanco	3B7	
30	Puro		4D8	Vacio
	Puro		5A12	
	Puro		5G11	
	Puro		6C1	
35				
	Dilución	1	2	3
40	Puro	0.0072	0.038	0.0309
	Puro	0.0077	3.9563	0.1163
45	Puro	0.0069	0.0093	0.0086
	Puro	0.0076	0.0753	0.0108
	Puro	0.0114	0.1139	0.0084
	Puro	0.009	0.0193	0.0123
	Puro	0.0087	0.2503	0.0085
50	Puro	0.0092	0.086	0.0121

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

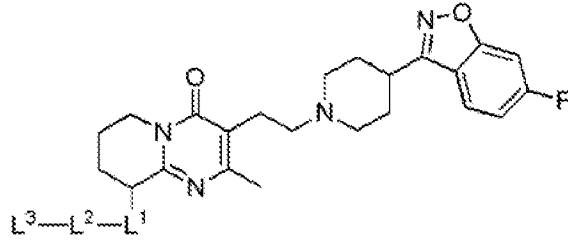
La FIG. 4 muestra el formato de inmunoensayo competitivo utilizado en un dispositivo de ensayo de flujo lateral en el que el anticuerpo de captura, risperidona/paliperidona, clon 5-9, se depositó en un chip junto con un conjugado de detección que consiste en la risperidona conjugada a un fluoróforo.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

REIVINDICACIONES

1. Los compuestos de Fórmula I

5

10



Formula I

15

en donde

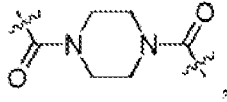
L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;

en donde n es 2 o 3;

L<sup>2</sup> es NHC(O),

20

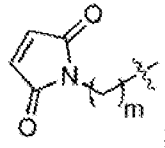
25



o está ausente;

L<sup>3</sup> es

30



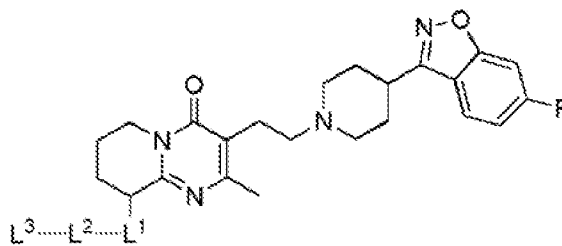
35

en donde m es 0, 1, 2, o 3; siempre que m solo puede ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente.

2. Los compuestos de Fórmula I

40

45



Formula I

50

en donde

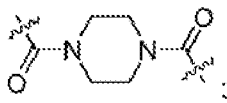
L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;

en donde n es 2 o 3;

L<sup>2</sup> es NHC(O), o

55

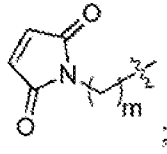
60



L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o

5

en donde m es 1, 2, o 3.

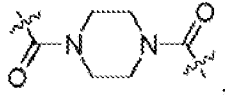


3. El compuesto de la Reivindicación 1, en donde

10

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),

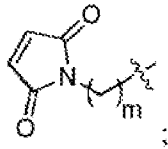
15



o está ausente;  
L<sup>3</sup> es

20

25



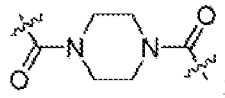
en donde m es 0, 1, o 2; siempre que m solo puede ser 0 si L<sup>2</sup> está ausente.

4. El compuesto de la Reivindicación 2, en donde

30

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;  
en donde n es 2 o 3;  
L<sup>2</sup> es NHC(O),

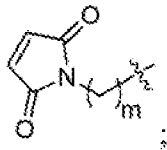
35



L<sup>3</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, o

40

45



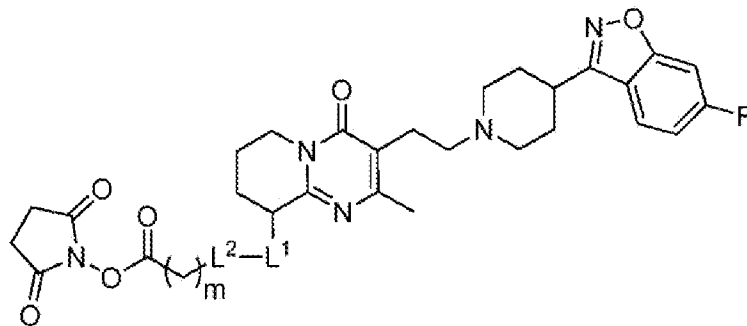
en donde m es 1, o 2.

5. Un compuesto que es:

50

55

60



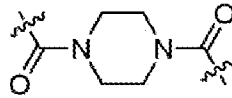
en donde

65

L<sup>1</sup> es OC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;

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

5



10 ; y  
 m es 0, 1, 2 o 3.

6. Un conjugado de un compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1-5 y un portador inmunogénico.

15 7. El conjugado de la Reivindicación 6, en donde el portador inmunogénico es una proteína.

8. El conjugado de la Reivindicación 7, en donde la proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina u ovoalbúmina.

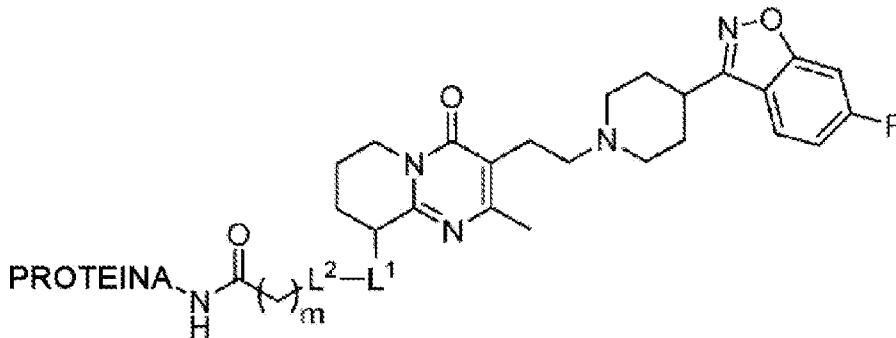
20 9. Un producto fabricado mediante el proceso de poner en contacto el compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1-5 con un portador inmunogénico, por ejemplo, en donde el portador inmunogénico es una proteína, por ejemplo en donde dicha proteína es hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina u ovoalbúmina.

10. El conjugado de la Reivindicación 7 u 8, en donde el conjugado es:

25

30

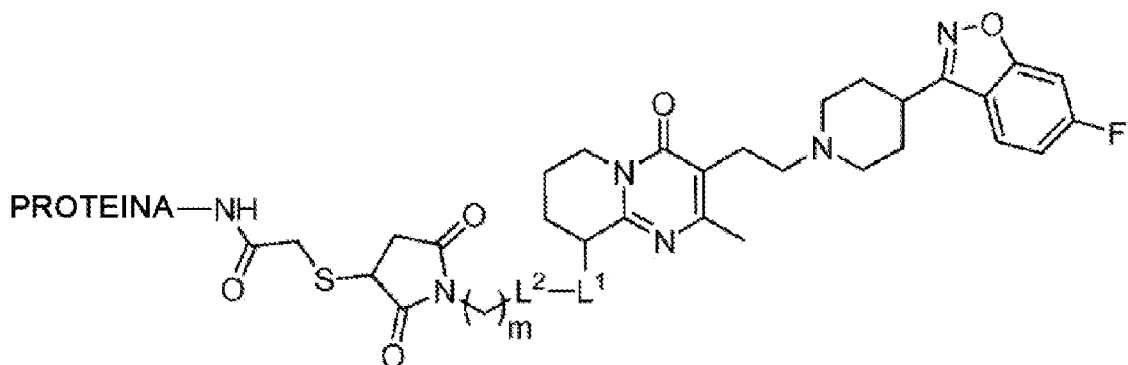
35



40

45

50



55

Fig. 1

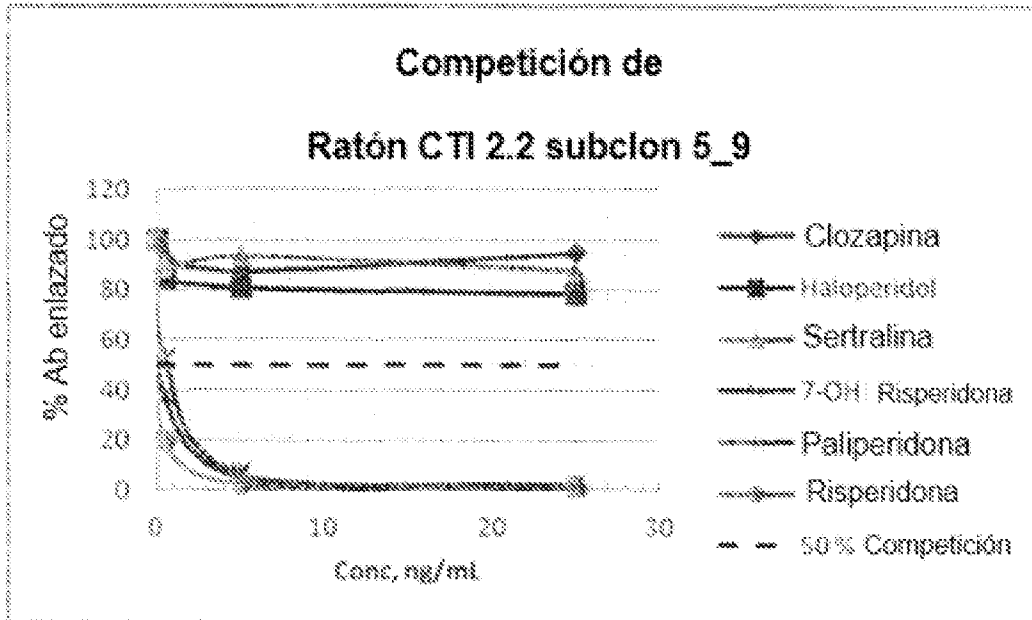


Fig. 2

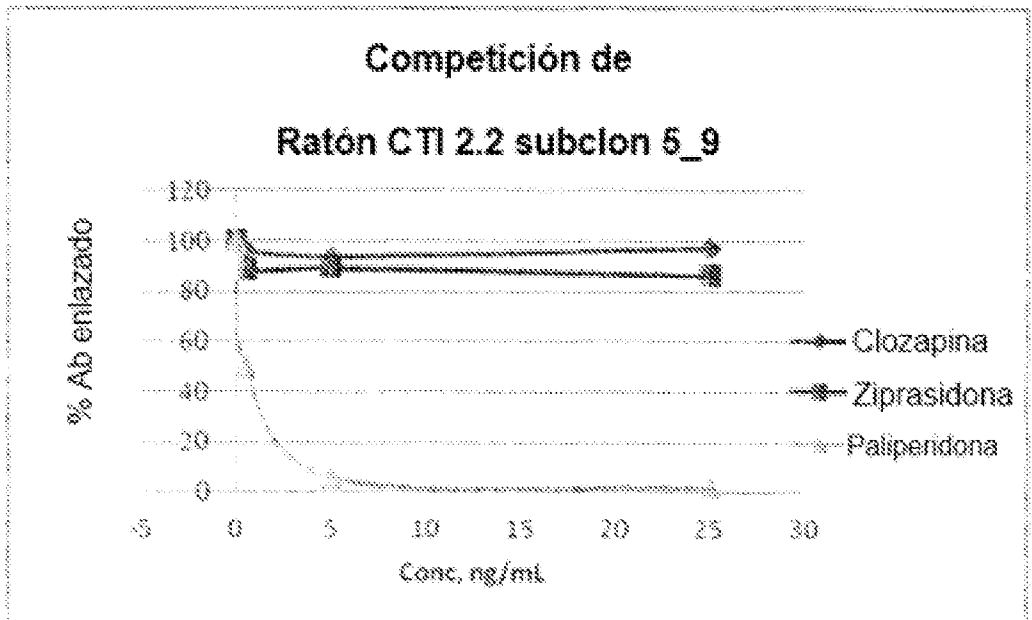


Fig. 3

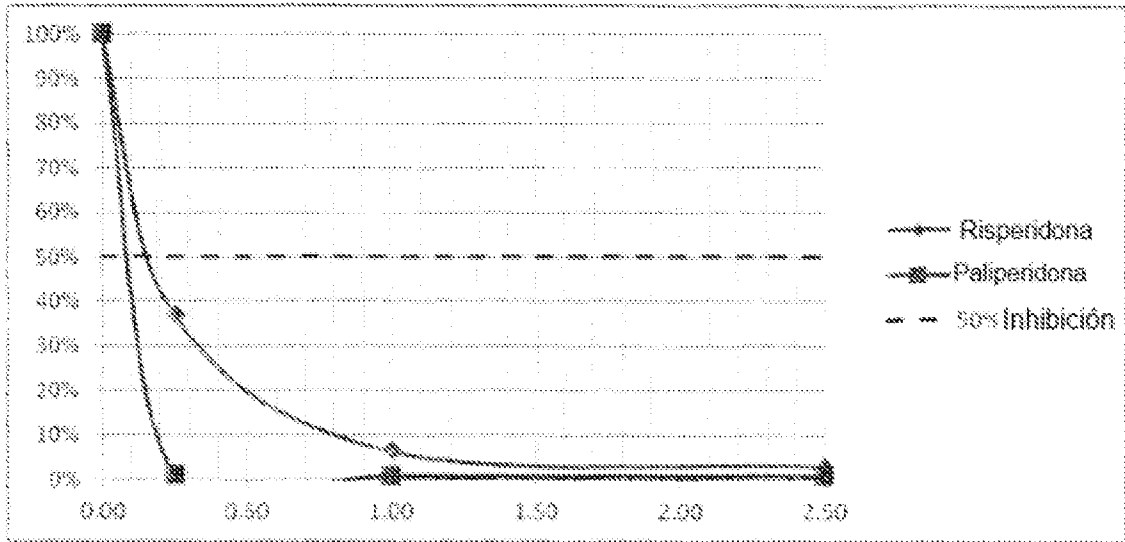


Fig. 4

Formatos competitivos: Ab Down

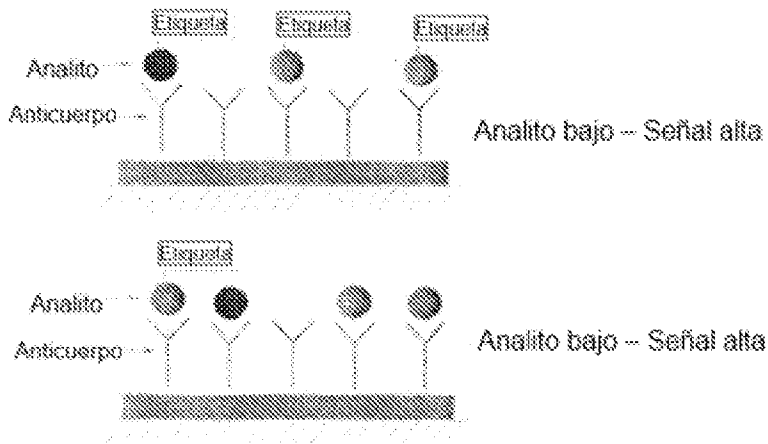


Fig. 5

