



402720

MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar
P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en
E S P A Ñ A
por VEINTE años

Int. Cl.:

a nombre de SYVA COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 3181 Porter Drive, Palo Alto, California, 4304, Estados Unidos de América, por:

"METODO MEJORADO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS EMPLEANDO UNA ENZIMA MODIFICADA" (Clase Internacional G01n)

5
10

Esta invención se refiere a un método novedoso para ensayos biológicos para determinar la presencia de un material específico, empleando una enzima modificada para amplificación. Empleando receptores específicos para uno o un grupo de materiales (denominados en lo sucesivo "ligandos") y enlazando una enzima con el ligando o un simulador de ligando para proveer un "ligando enlazado por enzimas", se provee un método extremadamente sensible para ensayar los ligandos. El receptor, ligando y ligando enlazado por enzimas son combinados en un orden arbitrario y se determina el efecto de la presencia del ligando sobre la actividad enzimática. Dependiendo de si las condiciones del ensayo son homogéneas o heterogéneas (en las que uno de los reactivos, vgr. el ligando o receptor está en-

POOR QUALITY

16 SET 1974

lazado a un soporte insoluble), se pueden usar varios recursos para ensayar la actividad enzimática y relacionar el resultado con la cantidad de ligando presente.

5 Existe una continua y apremiante necesidad de determinaciones cualitativas y cuantitativas, rápidas y exactas, de sustancias biológicamente activas que estén a concentraciones extremadamente bajas. El propósito de esta determinación puede variar en grado sumo. Actualmente, hay una gran necesidad de determinar la presencia de drogas o narcóticos en los fluidos corporales, tales como saliva, sangre u orina. Además, en el diagnóstico 10 médico, es importante con frecuencia conocer la presencia de diversas sustancias que son sintetizadas naturalmente por el cuerpo o ingeridas. Estas incluyen las hormonas tanto esteroides como polipéptidos, prostaglandinas, toxinas así como otros materiales involucrados en las funciones corporales. Frecuentemente, hay que enfrentarse a cantidades en extremo pequeñas y, en ocasiones, con diferencias muy pequeñas en las concentraciones.

15 Para satisfacer estas necesidades, se ha ideado un buen número de formas para analizar cantidades de huella de los materiales. Un método común es utilizar 20 cromatografía de capas delgadas (TLC). Mediante la determinación de los factores de flujo y utilizando reactivos específicos, se puede detectar la presencia de ciertos materiales; en muchos casos, el material en particular 25

19 SET 1974

puede ser aislado e identificado cuantitativamente, por ejemplo, mediante espectroscopía de masas o cromatografía en fase de gas. Sin embargo, la cromatografía de capas delgadas tiene cierto número de deficiencias, porque es lenta, requiere un alto grado de pericia para ejecutarla, es susceptible a una amplia gama de materiales de interferencia y sufre severas fluctuaciones en su confiabilidad. Por lo tanto, la ausencia de alternativas satisfactorias ha dado por resultado que se desarrollen intensos esfuerzos de investigación, para determinar métodos mejorados para separación e identificación.

Una alternativa a la cromatografía de capas delgadas ha sido el radioinmunoensayo. En él, se emplean anticuerpos para haptenos o antígenos específicos. Se utiliza un análogo radiactivo que emplee un átomo radiactivo de alto flujo y es ligado al antígeno. Al mezclar un anticuerpo con soluciones del hapteno o antígeno y el hapteno o antígeno análogo radiactivo, se evita que el análogo radiactivo se enlace con el anticuerpo en una cantidad relacionada directamente con la concentración del hapteno o antígeno en la solución. Luego, mediante la separación del análogo radiactivo libre del análogo radiactivo ligado con el anticuerpo, se puede determinar la cantidad de



16 OCT 1974

haptano o antígeno en la solución original.

El uso de materiales radiactivos no es deseable por un buen número de razones. En primer lugar, la radiactividad crea problemas de manejo y riesgos indeseables. En segundo lugar, la preparación de tales compuestos involucra peligros similares, aumentados grandemente por las cantidades mucho mayores de materiales radiactivos que están presentes. Además, el uso de materiales radiactivos exige un permiso de la Comisión de Energía Atómica, que somete al permisionario a una revisión de la Comisión para determinar que se conserve un mínimo de normas de trabajo. Estas normas pueden cambiar de tiempo en tiempo, por lo cual pueden involucrar gastos e inconvenientes adicionales para el usuario. Finalmente, la separación del análogo radiactivo, ligado y sin ligar, es difícil y susceptible de error. Ver, por ejemplo, Abraham, Prelim. Comm., 29, 866 (1969).

Además de los materiales antes mencionados, serían deseables los ensayos a concentraciones extremadamente bajas para una gran variedad de plaguicidas, tales como insecticidas, bactericidas, fungicidas, etc., así como otros contaminantes orgánicos, tanto en el aire como en el agua. Los contaminantes orgánicos pueden ser analizados y ensayados siempre que se pueda idear



un receptor y que el contaminante sea inerte a los reactivos empleados.

DESCRIPCION DE EJECUCIONES ANTERIORES

5 El uso del radioinmunoensayo se describe en dos artículos por Murphy, J. Clin. Endocr., 27, 973 (1967); *ibid* 28, 343 (1968). El uso de la peroxidasa como marcador en la determinación inmunológica de antígenos y anticuerpos se encuentra en Stanislawski y colaboradores., C.R. Acad. Sci. Ser. D. 1970 271 (16), 1442-5. (C.A. 74 1444B). Ver también, 10 Nakane y colaboradores., J. of Histochem. and Cytochem., 14, 929, (1967) y Avrameas, Int. Rev. of Cytology 27, 349 (1970). Una descripción de la cromatografía en capas delgadas para los ensayos se puede 15 encontrar en Stahl, Thin Layer Chromatography, Springer-Verlag, New York, 1969. Ver también, Perny colaboradores, Immunologic Methods in Steroid Determination, Appleto-Century-Crofts, New York, 1970.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 La detección de ligandos se obtiene, a concentraciones extremadamente bajas, utilizando sitios receptores especiales para el ligando y amplificación de enzimas del desplazamiento del ligando. Al enlazar un ligando o un simulador de ligando a una enzima 25 mientras se retiene la actividad enzimática y, luego,



combinando el ligando enlazado por enzimas con un receptor para el ligando, se puede determinar con facilidad la presencia y cantidad de ligando en una solución desconocida. Debido a la competencia por los sitios en el receptor entre el ligando enlazado por enzimas y el ligando libre, las dos mitades del ligando siendo agregadas al receptor en forma simultánea o en secuencia, se puede determinar la diferencia en actividad enzimática resultante de la presencia o ausencia del ligando, con un esquema analítico en particular. Esta diferencia estará relacionada con la cantidad de ligando presente en una solución desconocida. La actividad enzimática se determina fácilmente en formas conocidas, siguiendo el cambio en la concentración de una capa de base de enzimas o el producto de la capa de base, mediante técnicas normales.

DESCRIPCION DE LAS EJECUCIONES ESPECIFICAS

Esta invención provee un método para detectar o ensayar concentraciones extremadamente bajas de una amplia gama de materiales, relacionando la presencia de un desconocido particular, con la actividad enzimática. Se obtiene una amplificación al tener un gran número de moléculas formadas o transformadas como resultado de la presencia de una molécula. Esta amplificación se logra enlazando el compuesto que va a ser



16-SEPT-1974

ensayado a un simulador del compuesto, a una enzima. Esta ensamble se denomina ligando enlazado por enzimas. La molécula en particular que va a ser ensayada, se denomina ligando. El análogo del ligando
5 incluirá ya sea un ligando que está modificado reemplazando un portón con un grupo de enlace para enlazarlo a la enzima o, un simulador de ligando, el cual es un ligando modificado por un procedimiento que no sea el simple reemplazo de un portón para proveer un
10 sitio de enlace con la enzima. El ligando y el ligando enlazado por enzimas son, ambos, capaces de enlazarse en forma competitiva en sitios específicos en el receptor. También se debe mencionar que otros compuestos de estructura muy similar pueden servir como
15 ligandos capaces de competir por estos sitios, por ejemplo el glucurónido de morfina y la codeína, competirán con la morfina enlazada con enzimas para ligarse a ciertos tipos de anticuerpos de morfina. En la mayoría de los casos, esto es ventajoso para permitir el ensayo en busca de una clase de compuestos
20 que están relacionados muy de cerca, fisiológicamente.

Para el ensayo se pueden usar diversos recursos, tanto homogéneos como heterogéneos. El sistema
25 homogéneo no permite la fácil separación de los

reactivos y, por lo tanto, está limitado a la situación en la cual se tiene una inhibición significativa de la acción enzimática, cuando el ligando enlazado por enzimas es ligado al receptor. Por lo tanto, aunque el sistema homogéneo es más sencillo, el sistema heterogéneo, que requiere ligar el receptor a un soporte, provee mucha más versatilidad al permitir el empleo de diversos recursos analíticos en el ensayo.

10 En el método homogéneo, el ligando enlazado por enzimas es combinado con un receptor de alto peso molecular, lo cual da por resultado la inhibición de la actividad enzimática. Cuando un ligando y un ligando enlazado por enzimas son introducidos en una solución que contenga receptor del ligando, la actividad enzimática de la solución después de que son combinadas las tres sustancias, se verá afectada por la concentración del ligando que esté presente en la solución. Es decir, el ligando enlazado por enzimas y el ligando, competirán por los sitios en el receptor. Al tener una insuficiencia de sitios de receptor en equilibrio, el número de moléculas de ligando enlazado por enzimas que no están inhibidas por el receptor, estará relacionado directamente con el número de moléculas de ligando presentes en la solución. Esto se



puede lograr en dos formas: (1) ya sea por competencia, mediante lo cual el ligando enlazado por enzimas y el ligando sin introducidos en forma substancialmente simultánea en el receptor o, (2) el ligando enlazado por enzimas o el ligando pueden ser agregados primero al receptor y dejar que el sistema llegue al equilibrio y, luego se agregan el ligando o el ligando enlazado por enzimas, respectivamente, en efecto, para desplazar al material agregado originalmente.

5

10 Dado que la actividad enzimática será disminuida o inhibida cuando el ligando enlazado por enzimas está enlazado al receptor, la actividad enzimática de la solución estará relacionada directamente con la cantidad de ligando presente en la solución.

15 Las concentraciones de los reactivos, ligando enlazado por enzimas y el receptor pueden ser muy variadas. Normalmente, las concentraciones del receptor y del ligando enlazado por enzimas, serán desde alrededor de 10^{-4} hasta 10^{-14} M, más usualmente,

20 te, desde alrededor de 10^{-6} hasta 10^{-12} M. El límite inferior para la concentración del ligando enlazado por enzimas es predicado sobre la cantidad mínima que puede ser detectada. Esto variará con las diferentes enzimas así como con los diversos sistemas de detección.

25



La cantidad de receptor empleada, normalmente se calcula con base en los sitios en el receptor y variará de acuerdo con las concentraciones de ligando enlazado por enzimas, la proporción de ligando a enzima en el ligando enlazado por enzimas y la afinidad del receptor por el ligando. Usualmente, habrá cuando menos 1.0 sitio activo en el receptor por molécula de ligando enlazado por enzimas y menos de alrededor de 20 sitios activos por molécula de ligando como ligando enlazado por enzimas; pero, las proporciones sitio-molécula pueden ser tan altas como 1,000 a 1, dependiendo del tipo de ensayo y la afinidad del receptor. De preferencia, la proporción entre sitios activos en el receptor con las moléculas de ligando enlazado por enzimas, será, cuando menos, de 2 a 1, mientras que la proporción de sitios activos en el receptor con el ligando y el ligando enlazado por enzimas, será menor de alrededor de 5 a 1. La proporción variará en grado notable dependiendo de las constantes de enlace y de la cantidad de ligando que se sospeche esté presente. El método para determinar los sitios de enlace para el receptor, será descrito más adelante en la sección sobre experimentos.

El ligando enlazado por enzimas, tendrá relaciones de subunidades de enzima a ligando, en la



gama de alrededor de 0.01-100:1, con frecuencia 0.02-50:1 y, con más frecuencia, alrededor de 0.04-25:1. (Con proteínas, los ligandos suponen subunidades de proteína). El número máximo de enzimas por ligando será controlado por la naturaleza del ligando y su peso molecular. Con enzimas pequeñas (peso molecular de 12,000 a 80,000), habrán usualmente desde alrededor de 1 a 40, y más a menudo 2 a 35 ligandos por subunidad de enzima. Por lo general, habrá solamente una enzima por cada 2,000 de peso molecular del ligando y, más generalmente, sólo una enzima por cada 4,000 de peso molecular del ligando y, por lo normal, una enzima por cada 6,000 de peso molecular del ligando. Estos valores son valores promedio para la composición de ligando enlazado por enzimas.

En algunos casos, un cierto número de enzimas se enlazan juntas en una disposición estable, para formar un complejo multienzimático. Debido a la yuxtaposición de las enzimas, se puede efectuar secuencialmente un buen número de reacciones en forma eficiente, que proveen altas concentraciones localizadas de los reactivos. Por lo tanto, el ligando puede estar enlazado con una combinación de enzimas, con lo cual habrá una pluralidad de enzimas por ligando. Si fuera enlazado cierto número de ligandos al comple-



16 OCT 1971

jo multienzimático, se podría tener una relación
molar de 1:1 de enzimas a ligando aunque, en la rea-
lidad, habría una pluralidad de enzimas y ligandos
involucrados en un solo agregado. El número de enzi-
5 mas enlazadas juntas, ya sea como complejo multien-
zimático o por otro mecanismo, rara vez excederá de
20, usualmente no excederá de 10 y lo común estará
en la gama de 2 a 5 enzimas.

10 Con todos los demás factores iguales, mien-
tras mayor sea el número de enzimas por ligando, ma-
yor será la sensibilidad del ensayo. Sin embargo, las
enzimas pueden interferir con el reconocimiento del
receptor, afectar la solubilidad y ser perjudiciales
en otras formas. Por lo tanto, usualmente el número
15 de enzimas enlazadas a un ligando será tal, que no
habrá más de una cadena de polipéptidos de enzima por
cada 2,000 de peso molecular del ligando.

20 Cuando un ligando es un conjunto orgánico
grande, tal como una célula o un virus, el número
de enzimas enlazadas a la célula o el virus será de
millares, a fin de obtener la sensibilidad deseada.
El número de enzimas enlazadas será suficiente para
proveer una cantidad detectable de cambio en la capa
de base, pero no deberá ser tan grande como para inhi-
25 bir el reconocimiento por el receptor.



El número de ligandos enlazados a una enzima dependerá de: el número de sitios disponibles para enlazarse al ligando, el número de ligandos que se requiere para proveer el efecto deseado, por ejemplo, la inhibición cuando el ligando está enlazado al anticuerpo, el efecto sobre la solubilidad y actividad del número de ligandos enlazados a la enzima, efectos aleostéricos, etc.

Los efectos, sobre la enzima, de la sustitución del ligando pueden ser modificados hasta cierto grado. Por ejemplo, cuando el ligando está enlazado a lisina por medio de un carboxilo y el ligando es una molécula neutra, se puede usar un grupo de enlace que tenga una carga positiva, vgr. amonio o que tuviere una respuesta al pH similar a la respuesta de la lisina, vgr. una amina. Cuando el ligando es altamente lipófilo, por ejemplo, testosterona, por lo general será deseable minimizar el número de ligandos enlazados a la enzima. Cuando el ligando es del mismo tipo de carga que el grupo desplazado, ordinariamente se utilizará un grupo de enlace sin carga. Además, variando la funcionalidad del grupo de enlace, se pueden variar el número de ligandos enlazados con la enzima y los sitios en los cuales está enlazado el ligando.

16 SET. 1974

La concentración del receptor y la enzima
estará relacionada con la gama de concentración del
ligando que va a ser ensayado. La solución que va a
ser ensayada será usada directamente, salvo que esté
5 presente una concentración relativamente elevada del
ligando. Si está presente una concentración alta, la
solución desconocida será diluida de modo de proveer
una concentración conveniente. Sin embargo, en muchos
sistemas biológicos de interés, la cantidad de mate-
10 rial que se está ensayando será pequeña, en relación
y usualmente no se requerirá la dilución de la capa de
base desconocida.

En la técnica homogénea, se emplea un recep-
tor soluble para un ligando en particular. Para fines
15 ilustrativos, se considerará que el ligando es el
hapteno morfina y que el receptor será un anticuerpo
específico para la morfina. Se debe mencionar, como
digresión, que los anticuerpos reconocen por lo gene-
ral la forma molecular y la distribución de los gru-
20 pos polares en un ligando, aunque una parte de la mo-
lécula pudiera estar cambiada en forma significativa,
sin evitar el reconocimiento. Por ejemplo, tanto la
morfina como su glucurónido pueden estar enlazados con
ciertos anticuerpos de la morfina.

25 Una enzima se modifica, primero, enlazando



una o más moléculas de morfina con la enzima. Se puede usar cualquier enzima conveniente, que reaccione con una capa de base que pueda ser detectada con facilidad.

5

Se prepara una solución del anticuerpo a la concentración requerida. Solamente se requieren unos cuantos microlitos de la solución. El anticuerpo, mantenido a un pH al cual esté activo para enlazarse con la morfina, es introducido en una solución de morfina enlazada con enzimas a la concentración deseada. La reactividad de la combinación de anticuerpo y de solución de morfina enlazada con enzimas, se puede determinar tomando una alícuota, agregándola a su capa de base en condiciones en las cuales sea activa la enzima y determinando el cambio espectroscópico como función del tiempo, a una temperatura constante. La proporción de este cambio será el resultado que se debe obtener cuando no hay morfina presente en la solución desconocida.

10

15

20

Se toma una segunda alícuota y se agrega a la solución desconocida. La solución desconocida puede contener la capa de base y cualquiera otros aditivos que se requieran para la actividad enzimática. Como alternativa, la solución desconocida puede ser combinada, primero, con el anticuerpo (morfina

25



16

5 enlazada con enzima) y dejarla llegar a equilibrio y luego mezclarla con la capa de base. En cualquier caso, se determina la proporción de cambio en el espectro. Una variante de este método es agregar, combinadas, la morfina enlazada con enzimas y la solución desconocida al anticuerpo y, luego, agregar esta solución a la capa de base. Fácilmente se ocurrirán otras variaciones obvias.

10 Si todas las combinaciones de los reactivos, excepto la morfina, son mantenidas constantes y se emplean varias soluciones normales de morfina, entonces se puede relacionar el cambio en el espectro sobre periodos especificados de tiempo, con las concentraciones de morfina. Obviamente, el sistema normalizado se puede usar, después, para determinar en
15 forma rápida, exacta y eficiente, la cantidad de morfina u otro ligando en la solución desconocida.

20 En algunos casos, se preferirá el sistema heterogéneo. Esto ocurrirá cuando el receptor no inhibe suficientemente a la enzima enlazada al ligando, al ocurrir el enlace del ligando enlazado por enzimas con el receptor. Además, serán preferibles los sistemas heterogéneos, cuando las condiciones en las cuales el ligando enlazado por enzimas es enzimáticamente activo, son diferentes en forma notoria
25



a las condiciones en las cuales el receptor es activo para enlazarse con el ligando. Por ejemplo, un receptor puede ser altamente activo cerca de pH 7 y relativamente inactivo el pH básico, mientras que la actividad de las enzimas puede aumentar con un pH más alto. Hay otras situaciones que también favorecen al sistema heterogéneo. Por ejemplo, cuando está disponible una gran cantidad de un producto desconocido, pero su titulación es muy baja, se puede preparar una columna con un ligando enlazado por enzimas, enlazada con un soporte y complejados con un receptor. Luego, se puede usar todo el desconocido de la muestra para activar la enzima, sin dilución de la enzima, pasando la solución desconocida a lo largo de la columna. La enzima así activada que está en la columna, después puede ser ensayada mediante la adición de la capa de base de enzima a la columna y con el examen espectroscópico del efluente.

En los sistemas heterogéneos, se pueden enlazar a un soporte ya sea el ligando enlazado por enzimas, el receptor o el ligando. La presencia del soporte permite la fácil separación del reactivo enlazado al soporte sólido, desde la solución sobrenadante. La separación se puede lograr por: (1) centrifugación de una suspensión del soporte; (2) empleando el soporte

16 SET 1974

5 en una columna a lo largo de la cual son filtradas las soluciones o, (3) utilizando un soporte bidimensional, tal como un papel sobre el cual son pasadas las soluciones. Cuando el ligando enlazado por enzimas está enlazado a un soporte, el soporte es puesto en contacto en forma simultánea o secuencial con el receptor y el desconocido que contiene el ligando. Después de haber alcanzado el equilibrio, el soporte es separado mecánicamente de la solución y tratado con la capa de base en condiciones que maximizan la actividad de las enzimas y conservan el enlace del receptor. La cantidad de actividad enzimática estará basada en la cantidad de ligando que estaba presente en la solución desconocida.

15 Cuando el receptor está enlazado a un soporte, entonces, la enzima se enlaza al receptor a través del ligando con el cual está enlazada. Al ocurrir la adición simultánea o en secuencia de una solución que contenga el ligando y el ligando enlazado por enzimas al receptor enlazado a un soporte, la cantidad de ligando enlazado por enzimas que no está enlazada al soporte, estará relacionada con la concentración del ligando. Luego, la solución puede ser separada del soporte y, en efecto, se separa la enzima libre de la enzima enlazada con el soporte, se-



16 OCT 1974

guida de la adición de capa de base a la enzima libre y la determinación de la actividad enzimática.

5 Por supuesto, la actividad enzimática está relacionada con la cantidad de ligando que está presente con el ligando enlazado por enzimas que hay en la solución en la cual está dispersado el receptor enlazado a un soporte. Este método posee la ventaja única de que el receptor no necesita inhibir la actividad enzimática, porque la enzima que no está enlazada como resultado de la presencia del ligando, es separada de la enzima que está enlazada al soporte. Por lo tanto, la capa de base entra en contacto solamente con la enzima que está libre como resultado de la presencia del ligando y cualquier cambio en la concentración de la capa de base está relacionado directamente con la cantidad de ligando que ha entrado en contacto con el soporte.

10

15

20 Un sistema heterogéneo alternativo que tampoco requiere que el receptor inhiba la actividad de las enzimas, emplea el ligando enlazado a un soporte. Un receptor polivalente, es decir, un receptor con más de un sitio para enlace, tal como un anticuerpo, es agregado en forma simultánea o en secuencia junto con la solución que contiene el ligando, al soporte. La cantidad de receptor que se enlaza al ligando enlazado al soporte y el número de sitios libres para enlace

25

16 SET 1974

restantes en estos receptores, dependen de la cantidad de ligando libre en la solución original; luego, la cantidad de ligando enlazado por enzimas que no se enlaza al soporte, estará relacionada con la concentración del ligando, como en el procedimiento precedente.

Los ensayos, por lo normal, se llevarán a cabo a temperaturas moderadas, usualmente en la gama desde 10°C, hasta 50°C., y casi siempre en la gama de alrededor de 15 a 40°C. El pH de la solución para ensayo estará en la gama de alrededor de 5 a 10, usualmente 6 a 9.

El que haya oxígeno presente o que el ensayo se lleve a cabo en una atmósfera inerte, dependerá del ensayo en particular. Cuando el oxígeno pudiera ser una interferencia, normalmente se empleará atmósfera inerte. En general, se emplearán medios hidroxílicos, particularmente medios acuosos, porque estos son los medios en los cuales está activa la enzima. Sin embargo, puede estar presente también de 0 a 40% por volumen de otros líquidos como cosolventes, tales como alcoholes, ésteres, cetonas, amidas, etc. La selección particular del cosolvente dependerá de los otros reactivos que estén presentes en el medio, de su efecto sobre la actividad de las enzimas y de cuales-



quiera interacciones deseables o indeseables con la capa de base o los productos.

Si resulta conveniente, los reactivos pueden ser precipitados sobre un material básico en forma seca, de modo que cuando sean introducidos en un medio fluido, particularmente un fluido corporal, tal como saliva, orina o suero, sean activados los reactivos de modo que respondan a la presencia de un ligando. Al hacer que la capa de base de enzimas forme un producto que pueda ser fácilmente detectado, por ejemplo por el cambio de color, se puede determinar la presencia o ausencia de un ligando en particular.

Como ya se indicó, los anticuerpos, con frecuencia, reconocen una familia de compuestos, cuando la geometría y la distribución espacial de los grupos polares son similares. Con frecuencia, se puede variar la especificidad del anticuerpo si se establecen la estructura hapténica y el método de enlace al antígeno, al producir los anticuerpos. En algunos casos puede ser deseable usar dos o más anticuerpos, por lo general no más de seis anticuerpos, de modo que la solución de reactivo-anticuerpo sea capaz de detectar un grupo entero de compuestos, por ejemplo, barbitúricos o más de un grupo de compuestos, por ejemplo, morfina y barbituratos. Esto puede ser particularmente



18 OCT 1976

valioso para explorar una muestra a fin de determinar la presencia de cualquier miembro de un grupo de compuestos o, para determinar si está presente una clase particular de compuestos, por ejemplo, drogas de mal uso u hormonas sexuales. Cuando se utilizan combinaciones de anticuerpos, usualmente será necesario emplear combinaciones correspondientes de ligandos enlazados por enzimas.

Ligando

Pasando ahora a una consideración general de los reactivos, el primer reactivo que se considerará será el ligando. Se puede emplear cualquier ligando que sea de interés biológico y para el cual pueda hallarse un receptor apropiado, que tenga especificidad satisfactoria para el ligando. La literatura reciente contienen un número creciente de informes de receptores para una amplia y creciente variedad de materiales biológicamente activos. Los compuestos para los cuales se pueden proveer receptores, van desde fenilalquilaminas simples, por ejemplo, anfetaminas hasta polímeros de alto peso molecular, por ejemplo, proteínas y polisacáridos. Además de los compuestos o mezclas de compuestos relacionados, ciertos conjuntos de compuestos orgánicos, tales como células y virus, pueden ser detectados también por las técnicas



del inmunoensayo. Por lo tanto, las limitaciones en cuanto a las gamas de pesos moleculares, composiciones de compuestos o conjuntos que pueden ser ensayados, serán un tanto quiméricas.

5 Los ligandos incluirán productos tales como aquellos que son narcóticos, hipnóticos, sedantes, analgésicos, antipiréticos, anestésicos, drogas psicogénicas, relajadores musculares, estimulantes del sistema nervioso, agentes anticolinesterasa, agentes parasimpatomiméticos, agentes simpatomiméticos, agentes bloqueadores α -andrenérgicos, agentes antiandrenérgicos, agentes estimulanres y bloqueadores gangliónicos, agentes bloqueadores neuromusculares, histaminas, antihistamínicas, 5-hidroxitriptamina y antagonistas, medicamentos cardiovasculares, drogas antiarrítmicas, agentes antihipertensivos, drogas vasodilatadoras, diuréticos, plaguicidas (fungicidas, antihelmínticos, insecticidas, ectoparasiticidas, etc.) medicamentos antimaláricos, antibióticos, anti-
10 metabolitos, hormonas, vitaminas, azúcares, medicamentos tiróidicos y antitiróidicos, corticosteroides, insulina y medicamentos hipoglámicos orales y sus
15 metabolitos.

 Incluidos entre tales drogas, medicamentos
25 y agentes se encuentran alcaloides, esteroides, poli-



16 SET. 1977

péptidos, prostaglandinas, catecolaminas, xantinas, arilalquilaminas, heterocíclicos, por ejemplo, tiazinas, piperazinas, indolos y tiazolos; aminoácidos, etc.

5 En términos amplios, los ligandos serán compuestos orgánicos, desde alrededor de 100 hasta 10^6 de peso molecular, usualmente con un peso molecular desde alrededor de 125 hasta 40,000 y, casi siempre, desde alrededor de 125 hasta 20,000. Los ligandos, por lo general, tendrán desde alrededor de 8 hasta 50,000 átomos de carbono y desde alrededor de 1 hasta 35,000 heteroátomos.

10 Una parte substancial de los ligandos serán monómeros o polímeros de orden bajo, los cuales tendrán pesos moleculares en la gama desde alrededor de 100 hasta 2,000, usualmente 125 hasta 1,000. Otra parte significativa de los ligandos serán polímeros (compuestos con unidades recurrentes), los cuales tendrán pesos moleculares en la gama desde alrededor de 750 hasta 1,000,000, con frecuencia de 2,000 a 100,000 y por lo general de 2,000 a 50,000. Para los polímeros de peso molecular variable, se entiende el peso molecular promedio.

20 Los ligandos normalmente estarán compuestos de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, azufre,

25

16 SET 1974

fósforo, halógeno y metales, primariamente como sus cationes, tales como los metales alcalinos y alcalinos terrosos y los metales de los Grupos IB, IIB, VIIB y VIIIB, en particular, la tercera hilera de la tabla periódica. Casi siempre, los ligandos estarán compuestos principalmente por carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre.

En lo estructural, los ligandos pueden ser monómeros o polímeros, acíclicos, mono- o policíclicos, que tengan anillos carbocíclicos o heterocíclicos. Los ligandos tendrán una amplia variedad de funcionalidades, tales como halo, oxocarbonil, monoxocarbonil, amino, oxi (hidroxi, ariloxi, aliloxi y cicloaliloxi ("alil" significa un radical alifático monovalente), tioxi, ditio, hidrazo y combinaciones de las mismas.

Los ligandos pueden ser divididos en tres categorías diferentes, basadas en su relación biológica con el receptor. La primera categoría es la de antígenos, los cuales cuando son introducidos en el torrente sanguíneo de un vertebrado, dan por resultado la formación de anticuerpos. La segunda categoría es la de haptenos los cuales, cuando son enlazados con una proteína y esa proteína enlazada con hapteno es introducida en el torrente sanguíneo de un

10
18 SET 1974

vertebrado, se forman anticuerpos específicos para el hapteno. La tercera categoría de ligandos incluye aquellos que tienen receptores naturales en un organismo vivo y los receptores pueden ser aislados en una forma específica para el ligando.

Por supuesto, las sustancias biológicas que son nativas para una especie y que tienen receptores naturales en esa especie, también pueden ser haptenos cuando están enlazados con una proteína y son introducidos en un animal de la misma o de diferente especie. Por lo tanto, la clasificación es un tanto arbitraria, ya que el ligando puede ser un antígeno para una especie, un hapteno para otra especie y, en una tercera especie, puede tener receptores naturales.

Los antígenos, en su mayor parte, son por naturaleza proteínas o polisacáridos y son extraños al animal en el cual son inyectados.

El cuerpo de ligandos más importante para los propósitos de la invención, son los haptenos, o sea "Substancias que al ser inyectadas no dan origen a anticuerpos, pero que son capaces de reaccionar específicamente con anticuerpos para producir ya sea precipitación o inhibir la precipitación, se denominan haptenos. Esta definición se ha utilizado no solamente para incluir a las sustancias químicas simples que



son determinantes de la especificidad cuando están conjugadas con proteínas y que inhiben la precipitación, sino también a las sustancias obtenidas de fuentes naturales tales como los polisacáridos y el dextrano específicamente de tipo neumocócico, que no son antigénicos en el conejo al aplicar la inyección primaria", según Kabat y colaboradores, Experimental Immunochimistry, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, (1967). En la siguiente descripción, el término hapteno estará confinado a grupos no antigénicos introducidos artificialmente en proteínas que afectan la especificidad y se aplicará a tales dichos, sin que importe que el grupo esté o no este ligado con la proteína.

El tercer grupo de ligandos es el de aquellos que tienen receptores naturales. Los receptores pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, tales como el ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxiribonucleico (ADN) o membranas asociadas con células. Los ligandos ilustrativos que tienen receptores naturales, son la tiroxina, muchos esteroides tales como los estrógenos, cortisona, corticosterona y estradiol; los polipéptidos tales como la insulina y la angiotensina II, así como otros compuestos naturales biológicamente activos. Ver Murphy y colaboradores., J. Clin. Endocr.,



24, 187 (1964); Murphy ibidem 27, 973 (1967); ibidem
28, 343 (1968); BBA, 176, 626 (1969); McEwen y cola-
boradores, Nature, 226, 263, (1970) y Morgan y colabo-
radores, Diabetes (1966), Page y colaboradores, ibi-
dem, 28, 200 (1969).

Los ligandos también pueden ser puestos en
categorías por familias químicas que han quedado acep-
tadas en la literatura. En algunos casos y que quedan
incluidos en la familia para los propósitos de esta
invencción, estarán aquellas sustancias fisiomiméticas
que son similares en estructura a una parte de la es-
tructura natural y que, ya sea, imitan o inhiben las
propiedades fisiológicas de la sustancia natural.
Además, se incluirán grupos de sustancias sintéticas,
tales como los barbituratos y las amfetaminas. En adi-
ción, cualquiera de estos compuestos puede ser modifi-
cado para enlazarlo con la enzima en un sitio que oca-
sione sea destruida toda la actividad biológica. Estos
compuestos modificados se denominan simuladores de li-
gando.

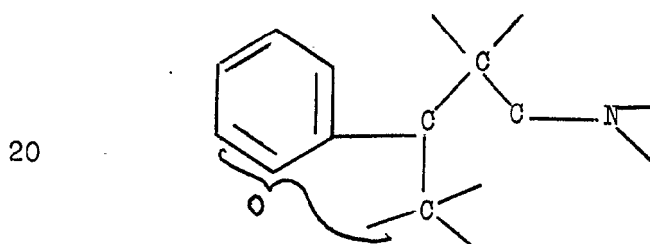
Alcaloides

La primera Categoría es la de los alcaloides.
Se incluyen en la categoría de alcaloides, para los
propósitos de esta invencción, aquellos compuestos que
son preparados sintéticamente para simular fisiológi-



5 camente a los alcaloides naturales. Todos los alcaloides naturales tienen amina y nitrógeno como miembro heteroanular. Los alcaloides sintéticos, normalmente, tienen una amina terciaria la cual puede o no puede ser un miembro heteroanular. Los alcaloides tienen una gran variedad de funcionalidades presentes en la molécula, tales como éteres, hidroxilos, ésteres, acetales, aminas, isoxazolo, olefinas todas las cuales, dependiendo de su posición particular en la molécula, pueden ser utilizadas como sitios para enlazarse con la enzima.

10 Un grupo de alcaloides preferido en particular, son los alcaloides de morfina y sus análogos sintéticos, fisiológicamente miméticos. Todas estas moléculas tienen las siguientes funcionalidad y estructura mínima



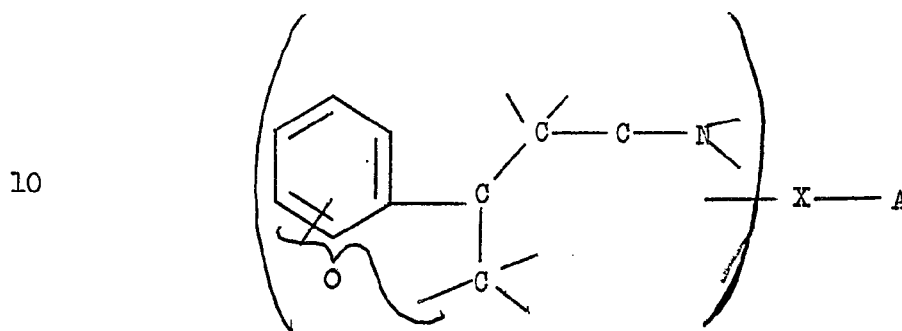
25 en donde las valencias libres son satisfechas por una



16 SET 1974

amplia variedad de grupos, primordialmente carbono e hidrógeno.

5 El análogo enlazado con enzimas de estos compuestos, en su mayor parte, tendrá la siguiente estructura esquelética mínima:



15 en donde X es un enlace o una funcionalidad, tal como imino, azo, oxi, tio, sulfonil, oxocarbonil, nonoxo-carbonil o combinaciones de las mismas. El oxígeno estará en las posiciones orto, meta o β . A es una enzima que está enlazada con X en un sitio que no sea

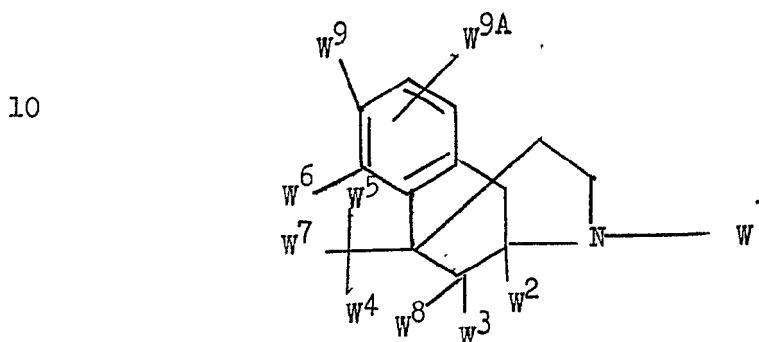
20 su sitio reactivo y retiene una parte substancial de su actividad enzimática natural. Solamente hay un X-A por molécula de ligando, aunque pueden haber muchos ligandos enlazados a través de X con la enzima A. Cuando se mencione una molécula con relación con

25 un $-X^{\pm}-A^{\pm}$, se debe entender la molécula de ligando.



Por lo tanto, la fórmula anterior y las fórmulas subsecuentes no se deben interpretar como limitativas de las moléculas a un ligando por enzima. Más adelante se ampliará esta descripción.

5 La morfina enlazada con enzima y sus análogos estrechamente relacionados, tendrán la siguiente fórmula:



en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o, un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente, se definirá a $-X^{\#}-A^{\#}$ (solamente hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

20 W^1 es hidrógeno o hidrocarburo de 1 a 8 átomos de carbono, particularmente alquilo de 1 a 3 átomos de carbono y aralquilo, por ejemplo, metilo y β -fenetilo;

25 W^2 es hidrógeno;



W^3 es hidrógeno;

W^4 es hidrógeno o, tomado junto con W^3 , es un radical divalente de 3 a 6 átomos de carbono y de 0 a 2 átomos de oxígeno, que forman un anillo carbocíclico de seis miembros con la cadena de carbono a la cual están enlazados, por ejemplo, propileno-1,3, 1-hidroxiprop-2-enileno-1,3, 1-hidroxipropileno-1,3, 1-acetoxipropileno-1,3, 1-acetoxiprop-2-enileno-1,3, 1-oxopropileno-1,3, 1-oxoprop-2-enileno-1,3;

10 W^5 es hidrógeno o hidroxilo;

W^6 es hidrógeno, hidroxilo o, tomado junto con W^5 , es oxi (-O-);

W^7 es hidrógeno o metilo;

W^8 es hidrógeno o hidroxilo;

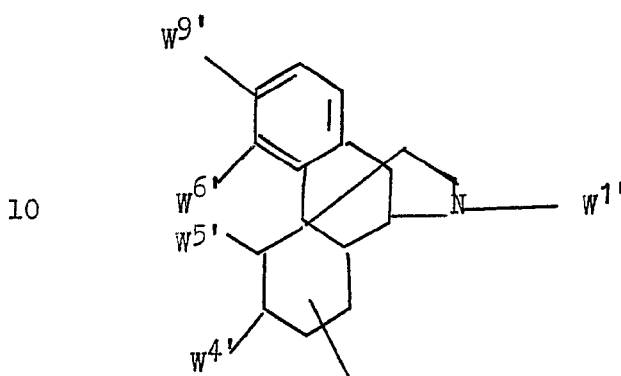
15 W^9 es hidrógeno, hidroxilo, aciloxi de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo, acetoxi (salvo que se indique lo contrario, acilo significa solamente nonoxocarbonilo), hidrocarbilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo, metoxi, etoxi 2-(N-morfolino)etoxi y
20 glucuronilo y,

W^{9a} es hidrógeno. (Debe quedar entendido que en todas las fórmulas, excepto cuando se indique una estructura mínima o esquelética, las valencias insatisfechas, son satisfechas por hidrógeno).

25 (Hidrocarbilo es un radical orgánico compuesto

solamente por hidrógeno y carbono puede ser saturado o insaturado, alifático, alicíclico, aromático o combinaciones de ello).

Los análogos de morfina tendrán la siguiente fórmula



0-1 sitio de insaturación etilénica

en donde:

cualquiera de los grupos puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se dará la definición de $-X^{\#}-A^{\#}$. (Solamente hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

W^1 es un alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo;

W^4 , es hidrógeno, hidroxilo, oxo o acetoxi;

W^5 es hidrógeno o hidroxilo;

W^6 es hidrógeno, hidroxilo o, tomado junto con W^5 , es oxi (-O-) y,



16 SEP 1974

W^9 es hidroxí o alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono.

5 Los narcóticos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima incluyen morfina, mheroína, hidromorfona, oximorfona, metopon, codeína, hidrocodona, dihidrocodeína, dihidrohidroxicodeína, folcodina, dextrometorfan, fenazocina y sus metabolitos.

10 Los compuestos preferidos tienen W^1 o W^9 como $-X^x-A^x$ o tienen a W^3 y W^4 tomados juntos, para proveer $A^x-X^x-CHCH_2CH_2-$ o, $A^x-X^x-CH-CH=CH-$.

15 Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima incluyen O^3 -carboximetilmorfina, N-(2'-carboxipropil) O^3 -metilmorfina, succinato de O^3 -metil, O^7 -morfinil, 2-aza-2-(2''-feniletíl)-5,9-dimetil-6,7-(5'-carboximetoxibenzo)biciclo(3,3,1^{1,5})oct-6-eno, O^3 -etil, O^7 -(3'-aza-5-cloropentil)morfina, O^7 -acetil, O^3 -carboximetilmorfina, 7,8-dihidro-14-hidroximorfinona, O-carboximetialoxima y O^3 -(2'-aminoetil) 20 morfina.

25 Debe quedar entendido que los diversos grupos son seleccionados de modo que se relacionan con compuestos conocidos de interés fisiológico. La diferencia primaria entre los compuestos conocidos y los compuestos de referencia, es el grupo de enlace y la presencia de la enzima.

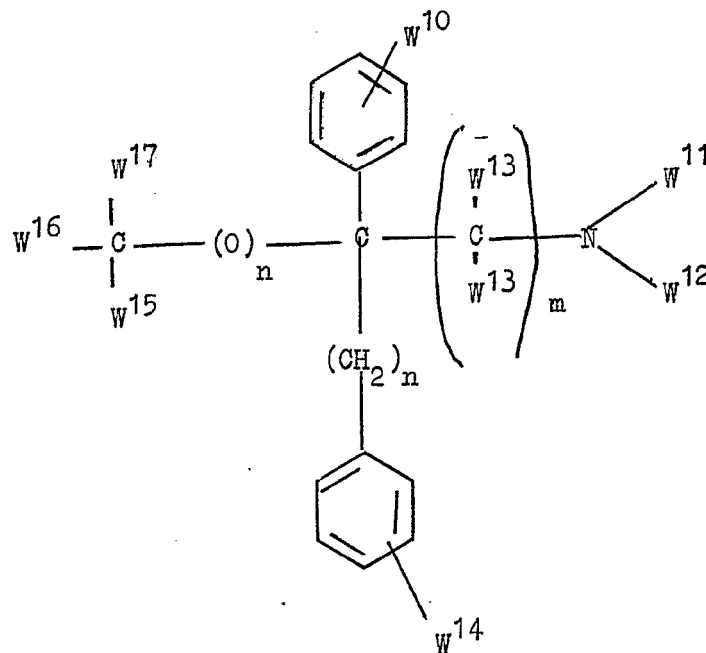
16 SET 1971

Otro grupo de compuestos que tienen actividad narcótica son la metadona y sus análogos que, en su mayor parte, tienen la siguiente fórmula

5

10

15



en la cual:

cualquiera de los grupos puede ser $-X^{\text{R}}-A^{\text{R}}$ o un H
 de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado
 por $-X^{\text{R}}-A^{\text{R}}$. Subsecuentemente se definirá $-X^{\text{R}}-A^{\text{R}}$. (So-
 lamente hay un $-X^{\text{R}}-A^{\text{R}}$ por molécula);

n es 0 ó 1, siendo usualmente el mismo en ambos ca-
 sos;

25

m es 2 o 3;

16 SET 1974

W¹⁰ es hidrógeno;

W¹¹ y W¹² son hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono por ejemplo metilo o, pueden ser tomados juntos para formar un anillo de 6 miembros con el átomo de nitrógeno al cual están fijados, por ejemplo
5 pentileno-1,5 y 3-oxa o 3-azapentileno-1,5;

W¹³ es hidrógeno o metilo y solamente un W¹³ es metilo

W¹⁴ es hidrógeno;

10 W¹⁵ es hidrógeno o hidroxilo;

W¹⁶ es hidrógeno, aciloxi de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo propionoxi o, hidroxil (cuando tanto W¹⁵ como W¹⁶ son hidroxil, se entenderá el grupo oxo) y,

15 W¹⁷ es hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo etilo.

Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima son metadona, dextromoramida, dipipanona, fenadoxona, propoxifeno (Darvon) y acetilmetadona.
20

También están incluidos los metabolitos de la metadona y análogos de la metadona. Entre los metabolitos de la metadona, está N-metil-2-etil-3,3-difenil-5-metilpirrolina.

25 Los compuestos preferidos son cuando W¹¹ o

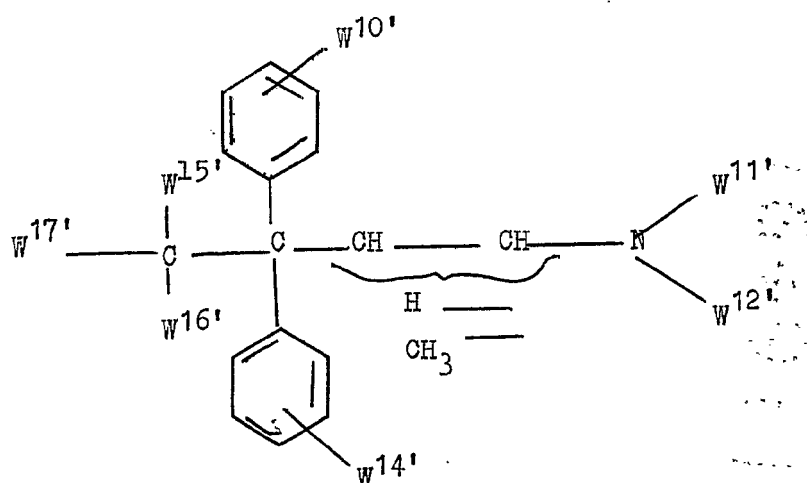


o W^{17} son $-X^{\#}-A^{\#}$.

Una clase más reducida de metadona y sus compuestos, tienen la fórmula:

5

10



15

en la cual:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$ (Solamente hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

20

$W^{10'}$ y $W^{14'}$ son hidrógeno;

$W^{11'}$ y $W^{12''}$ son metilo o son tomados juntos

con el átomo de nitrógeno al cual están enlazados, para formar un anillo morfolino o piperidino;

$W^{15'}$ y $W^{16'}$ son hidrógeno, hidroxilo o acetoxi,

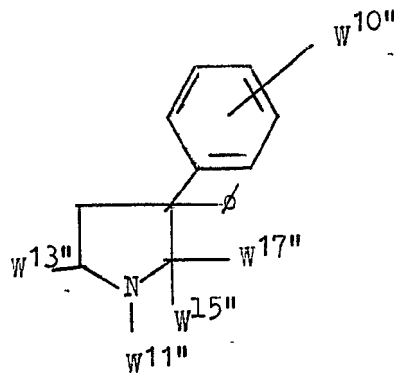
25

siendo por lo menos uno, hidroxilo o acetoxi y,

W^{17'} es alquilo de 1 a 3 átomos de carbono.

Los metabolitos de la metadona y los análogos próximos en su mayor parte, tendrán la siguiente fórmula:

5



10

en la cual:

15 cualquiera de los grupos W puede ser -X^z-A^z o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por -X^z-A^z. Subsecuentemente se definirá -X^z-A^z (Solamente hay un -X^z-A^z por molécula);

∅ es fenilo;

W^{10''} es hidrógeno;

20

W^{11''} es hidrógeno, metilo o una valencia libre unida con W^{15''};

W^{13''} es hidrógeno o metilo;

25 W^{15''} es hidrógeno, hidroxilo, o, tomando junto con W^{11''}, forma un doble enlace entre el átomo de nitrógeno y el átomo de carbono a los cuales están respec-

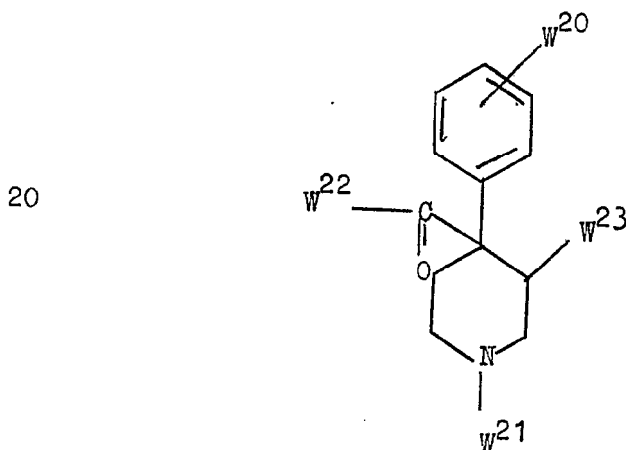


tivamente enlazados W¹¹" y W¹⁵" y,

W¹⁷" es alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, usualmente 2 átomos de carbono.

Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima incluyen fenilbencil(1-dimetilamino-2-propil)metilsuccinato; fenilbencil(1-dimetilamino-2-propil)metiloxalato; difenil(2-dimetilamino-1-propil)metilmaleato; orto-carboximetil-4,4-difenil-7-dimetilamino-2-heptanona-oxima; 4,4-difenil-7-dimetilamino-3-octilsuccinato; N-(2,2-difenil-3-metil-4-morfolino-butiril)glicina y ácido 3-etil-4,4-difenil-6-dimetilaminohept-2-enoico.

El tercer grupo de compuestos que tienen actividad narcótica y que son meperidina o análogos de meperidina tienen, en su mayor parte, la siguiente fórmula:



25 en la cual:



16 27 1974

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

W^{20} es hidrógeno;

5 W^{21} es hidrógeno, alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo; fenilaminoalquil, por ejemplo, fenilaminopropil o aminofenilalquil, por ejemplo:

(S -(para-aminofenil)etil (alquilo de 2 a 3 átomos de carbono)

10 W^{22} es hidroxil o alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo, etoxi;

W^{23} es hidrógeno o metilo.

Los compuestos ilustrativos son meperidina, alfaprodina, alvodina y anileridina.

15 Los compuestos preferidos son aquellos en donde W^{21} o W^{22} es $-X^{\#}-A^{\#}$ o un hidrógeno de W^{21} está reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$.

20 Los compuestos ilustrativos que pueden estar enlazados con una enzima incluye ácido 1,3-dimetil-4-fenil-4-piperidinilcarboxílico, 1-carboximetil-4-fenil-4-carboxilpiperidina y N-(1-metil-4-fenil-4-piperidilcarbonil)glicina.

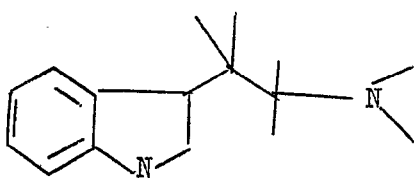
25 Un segundo grupo de ligandos de interés están basados en la triptamina y recaen dentro de la clase de alcaloides de indolo, más específicamente alcaloides



16 SEP 1974

de cornezuelo. Estos compuestos tendrán la siguiente estructura mínima:

5



10

en los cuales las valencias libres están satisfechas con una gran variedad de grupos, primariamente carbono e hidrógeno, aunque pueden estar presentes otros substituyentes, tales como grupos carboxi, grupos hidroxilo, grupos ceto, etc. El miembro más

15

común de esta clase que encuentra uso es el ácido lisérgico, principalmente como su dietilamida. Otros miembros de esta clase incluyen ergotamina, ergotaminina, ácido isolisérgico y ergosina. Otros miembros de la familia de alcaloides de indolo que también pueden ser ensayados, son el grupo estricnino y el grupo indolopiridocolino, los cuales tienen como miembros a la yohimbina y la reserpina.

20

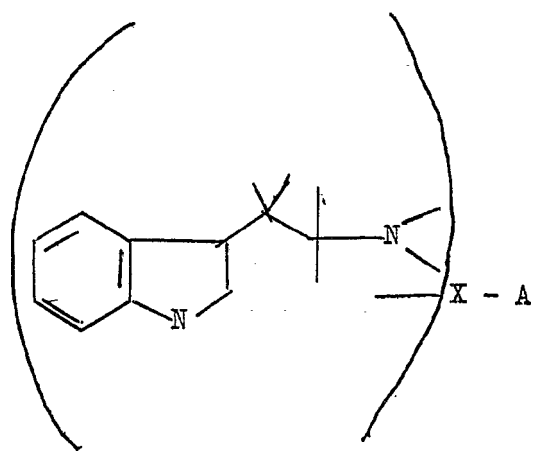
Los alcaloides de indolo substituidos por

25

16 SET 1974

enzimas, tendrán la siguiente fórmula:

5



10

en donde X y A tienen las definiciones expresadas anteriormente.

15

Otros grupos de alcaloides incluyen los alcaloides de esteroides, los alcaloides de iminazolil, alcaloides de quinazolina, alcaloides de isoquinolina, alcaloides de quinolina, siendo la quinina el más común y los alcaloides de diterpeno.

20

En su mayor parte, los grupos de alcaloides enlazados a una funcionalidad de enzima tendrán un peso molecular desde alrededor de 300 a 1500, más usualmente de alrededor de 400 a 1000 de peso molecular. Los grupos de alcaloides están, por lo normal, compuestos tan sólo de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno; el oxígeno está presente como oxi y oxo y el nitrógeno está presente como amino o amido.

25

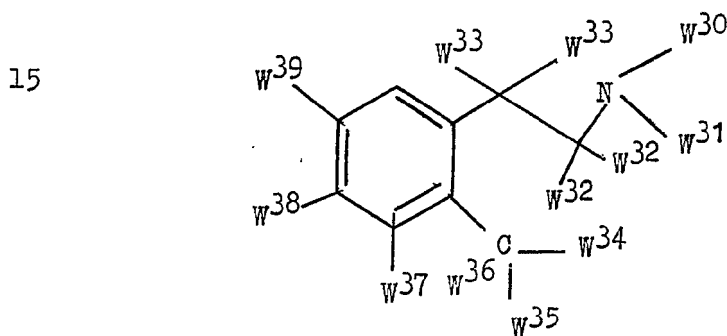
18 SEP 1974

De importancia significativa son los medicamentos y drogas que, aunque tienen un uso médico benéfico y apropiado, han encontrado distribución fuera del uso médico y se ha abusado de ellos.

5 Los grupos ilustrativos dentro de esta categoría son las amfetaminas, barbituratos, cocaína y otras drogas que se usan para proveer estímulos emocionales.

Catecolaminas

10 El primer grupo son las catecolaminas de la fórmula



20

en donde:

cualquiera de los grupos puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos puede ser reemplazado por $X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$. (Sola-

25



16 SEP 1972

mente hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula;

W^{30} es hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo;

5 W^{31} es hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo;

W^{32} y W^{33} son hidrógeno;

W^{34} es hidrógeno, hidroxilo, dimetoxicarboxifenacilo y dimetoxi-alfa-ftalidil;

10 W^{35} y W^{36} son hidrógeno, uno de los cuales puede ser tomado con W^{31} para formar un enlace y, cuando W^{31} y W^{35} son tomados juntos, cada uno de W^{32} y W^{33} y de W^{30} y W^{36} puede ser tomado junto para formar un doble enlace;

15 W^{37} es hidrógeno o alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metoxi;

W^{38} y W^{39} son hidroxilo o alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metoxi.

Los compuestos ilustrativos incluyen codeína, narceína, noscapina y papaverina.

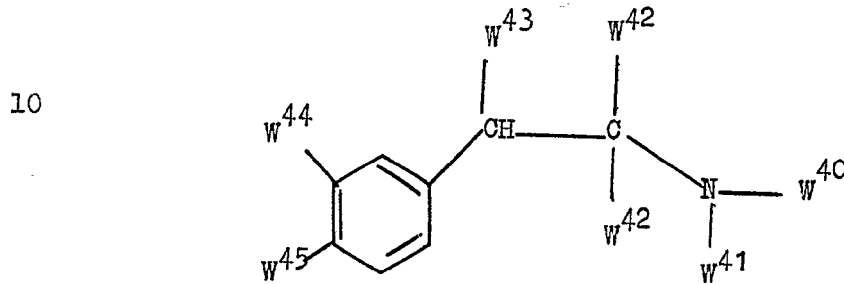
20 Los compuestos preferidos son en donde W^{30} , W^{38} o W^{39} son $-X^{\#}-A^{\#}$ o tienen un hidrógeno reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$.

25 Los compuestos ilustrativos que pueden estar enlazados a una enzima son narceína, 1-carboximetil-2-metil-6,7-metilendioxi-8-metoxi, 1,2,3,4-te-

16 SET 1974

trahidroisoquinolina y, 1-(2',3',4'-trimetoxi-2-carboxibencil)-2-metil-6,7-metilendioxi-8-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolina.

Otro grupo de catecolaminas son la epinefrina o amfetaminas y los compuestos relacionados. Estos compuestos tienen la fórmula:



en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $-X^{\#}-A^{\#}$ (Solamente hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

W^{40} y W^{41} son hidrógeno, 2-fenil-2-butil o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo e isopropilo, preferiblemente uno es hidrógeno;

cada W^{42} es el mismo o diferente y es hidrógeno, alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo



16 SET 1974

metilo y etilo y carboxi, habiendo un solo carboxi
o, un W^{42} puede ser tomado junto con W^{41} para for-
mar un anillo de piperidina; usualmente W^{42} es hi-
drógeno o metilo;

5 W^{43} es hidrógeno o hidroxilo y,
 W^{44} y W^{45} son hidrógeno, hidroxilo o alcóxido
de 1 a 3 átomos de carbono.

Los compuestos ilustrativos que pueden es-
tar enlazados con una enzima son efedrina, epinefri-
na, L-dopa, cohefrina, bencedrina (amfetamina), pa-
redrina, metamfetamina, fentermina, metilfenidato
10 y norefedrina.

Los compuestos ilustrativos que pueden es-
tar enlazados a una enzima incluyen ácido 3-(3',4'-
15 dihidroxifenil)-3-hidroxi-propiónico; N-(B-(B,3-4-tri-
hidroxifen)etil) N-metilglicina; N-(1-fenil-2-pro-
pil) N-metilglicina; ácido N-(1-fenil-2-propil)oxa-
lámico; ácido O-(1-fenil-2-metilamino-1-propil)gli-
cólico; ácido para-(2-dimetilaminopropil-1)fenoxi-
20 acético; N-(1'-fenil-2'-propil)glicina; ácido 4-me-
tilamino-4-fenilvalérico; ácido para-(2-aminopropil-
-1)fenoxiacético y, ácido 3-amino-4-fenilbutírico.

Cuando W^{44} y W^{45} son hidrógeno, los com-

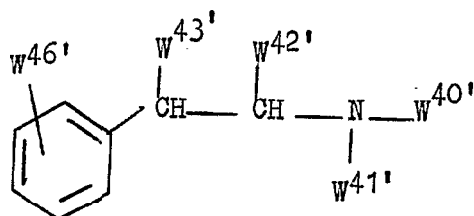
25



16

puestos preferidos tendrán la siguiente fórmula:

5



en donde:

10

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$;
 o un H de cualquiera de los grupos W puede estar
 reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se defini-
 rá $-X^{\#}-A^{\#}$ (Solamente hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

$W^{40'}$ y $W^{41'}$ son hidrógeno o alquilo de 1 a 3
 átomos de carbono, preferiblemente uno es hidrógeno;

15

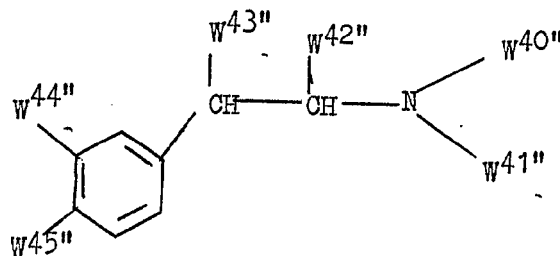
$W^{42'}$ es hidrógeno o metilo;

$W^{43'}$ es hidrógeno o hidroxilo;

$W^{46'}$ es hidrógeno.

Quando W^{44} y W^{45} son oxi, los compuestos
 preferidos tienen la siguiente fórmula

20



25

en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá

5 $X^{\#}-A^{\#}$ (Solamente hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

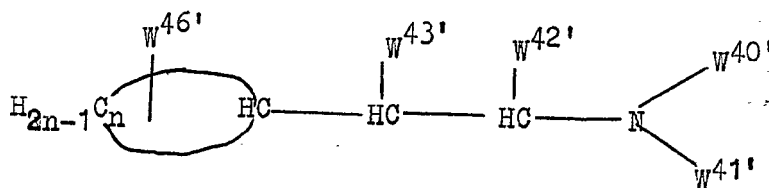
$W^{40''}$, $W^{41''}$ y $W^{42''}$ son hidrógeno o metilo;

$W^{43''}$ es hidrógeno o hidroxilo y,

$W^{44''}$ y $W^{45''}$ son hidroxilo o metoxilo

10 Los compuestos estrechamente relacionados con las amfetaminas son aquellos en donde en sustitución del anillo de fenilo se usa un anillo saturado de 5 o seis miembros. Estos compuestos tendrán la siguiente fórmula:

15



20

en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá

25 $X^{\#}-A^{\#}$ (Solamente hay un $X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

16 SEP 1974

W^{40} hasta W^{43} tienen la definición expresada antes;

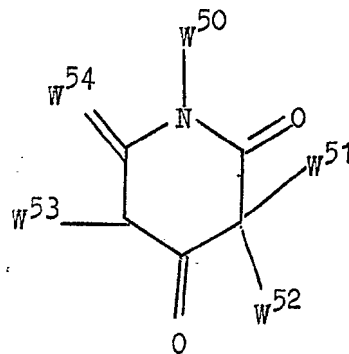
W^{46} es hidrógeno y,

n es un entero de 4 a 5.

5 Barbituratos

Los barbituratos son una amplia clase de drogas sintéticas que encuentran uso y abuso extensos y frecuentes. Estos compuestos son fácilmente accesibles en su forma sintética y su uso es vigilado con dificultad. Los compuestos que encontrarán uso recaen en la fórmula:

15



en donde:

20 cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}-$ o un H de cualquiera de los grupos W puede estar reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

25 W^{50} es hidrógeno, alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo o catión de metal alcalino,

por ejemplo, sodio;

5 W^{51} y W^{52} son hidrógeno, alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o hidrocarburo arilo de 1 a 8 pero más generalmente 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, etil, n-butil, α -metilbutil, isoamilo, alilo, Δ^1 -ciclohexenilo y fenilo; por lo general W^{52} es hidrocarburo de 2 a 8 átomos de carbono;

10 W^{53} es hidrógeno o catión de metal alcalino por ejemplo sodio;

W^{54} es oxígeno o azufre.

15 Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima son Veronal, Medinal, Luminal, Prominal, Soneryl, Nembutal, Amital, Dial, Phenadorn, Seconal, Evipan, Fenobarbital y Pentotal.

Los compuestos preferidos tendrían, como $-X^{\#}-A^{\#}$ a W^{50} o W^{51} o un hidrógeno de W^{50} o W^{51} . También se prefiere cuando uno de W^{51} y W^{52} es un alquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

20 Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados con una enzima incluyen: ácido 5,5-dietil-1-carboximetilbarbitúrico; ácido 5-etil-5-n-butil-1-succinilbarbitúrico; ácido 5-etil-5-fenil-1-(N-(2"-cloroetil)2"-aminoetil)barbitúrico; ácido 25 5-(2'-carboxi- Δ^1 '2'-ciclohexenil)-1,5-dimetilbar-

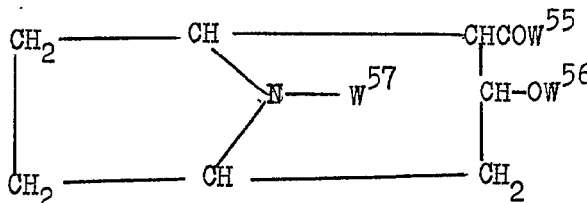


bitúrico y, ácido 1-metil-5-etil-5(p-carboxifenil) barbitúrico.

Cocaína

5 Una droga de significativa importancia en su cantidad de uso es la cocaína. La cocaína marcada con enzimas o los metabolitos o análogos de la cocaína, tales como la ecgonina tendrán, en su mayor parte, la siguiente fórmula:

10



15

en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser -X^z-A^z o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por -X^z-A^z. Subsecuentemente se definirá X^z-A^z (Sólo hay un X^z-A^z por molécula);

20

W⁵⁵ es hidroxilo, metoxi y amino;

W⁵⁶ es hidrógeno o benzilo y,

W⁵⁷ es hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo.

25

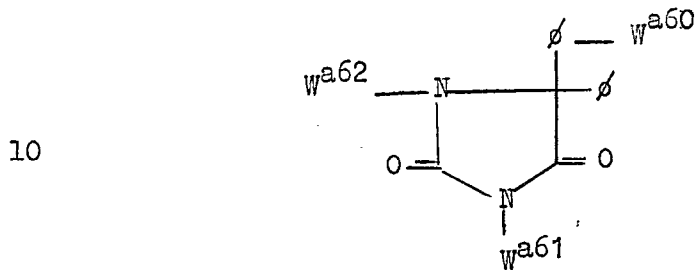
Los compuestos ilustrativos que pueden es-

16 SET 1974

tar enlazados a una enzima incluyen el ácido norecognil-8-acético y la N-carboximetil norcocaína.

Difenilhidantoína

Otro compuesto de interés es el medicamento
5 antiepiléptico difenilhidantoína. Este compuesto y sus análogos tendrán la siguiente fórmula:



en donde:

15 cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\text{X}}-A^{\text{X}}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\text{X}}-A^{\text{X}}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\text{X}}-A^{\text{X}}$ (Sólo hay un $-X^{\text{X}}-A^{\text{X}}$ por molécula);

20 ϕ es fenilo y W^{a60} , W^{a61} y W^{a62} son hidrógeno.

Aminoácidos, Polipéptidos y Proteínas

El siguiente grupo de compuestos son los
aminoácidos, polipéptidos y proteínas. En su mayor
parte, los aminoácidos tienen un contenido de carbono
25 en la gama de 2 a 14 átomos de carbono e incluyen



una variedad de grupos funcionales tales como mer-
capto, ditio, hidroxil, amino, guanidil, pirrolidi-
nil, indolil, imidazolil, metiltio, yodo, difeniléter,
hidroxifenil, etc. Estos, por supuesto, son princi-
5 palmente los aminoácidos relacionados con los huma-
nos y en los animales y las plantas se encuentran
otros aminoácidos.

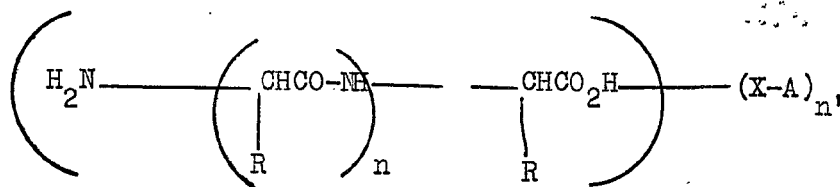
Los polipéptidos, por lo general, abarcan
de alrededor de 2 a 100 unidades aminoácido (por lo
10 general con peso molecular de menos de alrededor
de 12,000. Los polipéptidos mayores son llamados
arbitrariamente proteínas. Las proteínas están com-
puestas, por lo general, de 1 a 20 cadenas de poli-
péptidos, llamadas subunidades, que están asociadas
15 por enlaces covalentes o no covalentes. Las subuni-
dades son desde alrededor de 100 a 300 grupos ami-
noácido (aproximadamente 10,000 a 35,000 de peso mo-
lecular).

Los polipéptidos y subunidades de proteína
20 individuales tienen, por lo normal, de alrededor
de 2 a 300 y usualmente de alrededor de 2 a 150 gru-
pos aminoácido recurrentes. Por lo general, los po-
lipéptidos y subunidades de proteína de interés ten-
drán un peso molecular no mayor de 40,000, por lo co-
25 mún no más de alrededor de 20,000 de peso molecular


 16 SET 1974

y mayor de alrededor de un peso molecular de 750.
 Cualquiera de los aminoácidos se puede utilizar para preparar el polipéptido. Debido a la amplia variedad de grupos funcionales que están presentes en los aminoácidos y con frecuencia están presentes en los diversos polipéptidos naturales, la enzima puede ser enlazada a cualquier funcionalidad conveniente. Por lo general, la enzima puede ser enlazada a un grupo cisteína, lisina o arginina, aunque se puede usar serina, treonina o cualquier otro aminoácido con una funcionalidad conveniente, por ejemplo, carboxi e hidroxí.

En su mayor parte, los polipéptidos marcados con enzimas tendrán la siguiente fórmula:



en donde X y A tienen la definición expresada previamente y R es un residuo de aminoácido, n es un entero de 1 a 20,000, más usualmente de 1 a 500 y por lo general de 2 a 200. n' es un entero de cuando me-



nos uno y no mayor que el peso molecular del polipéptido dividido entre 20,000. Con los ligandos pequeños, solamente estará enlazada una enzima a un ligando; pero con los ligandos de alto peso molecular, tales como polipéptidos con peso molecular de alrededor de 4,000 o mayor, se puede enlazar una pluralidad de enzimas al ligando.

Los aminoácidos ilustrativos incluyen glicina, alanina, serina, histidina, metionina, hidroxiprolina, triptófano, tirosina, tiroxina, ornitina, fenilalanina, arginina y lisina. Los polipéptidos de interés son ACTH, oxitocina, hormona luteinizadora, insulina, proteína de Bence-Jones, gonadotropina coriónica, gonadotropina pituitaria, hormona del crecimiento, renina, globulina de enlace de tiroxidos, bradykinina, angiotensina, hormona foliculobes-
timulante, etc.

En muchos casos será deseable digerir una proteína y ensayar si hay fragmentos pequeños de polipéptidos. Luego, la concentración del fragmento puede ser relacionada con la cantidad de la proteína original.

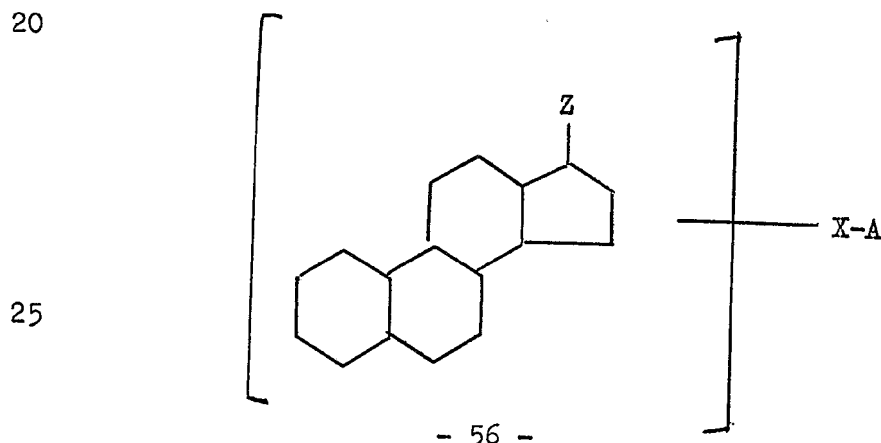
Esteroides:

Otro grupo importante de compuestos que encuentran uso en esta invención, son los esteroides,

que tienen una amplia gama de funcionalidades, dependiendo de su función en el cuerpo. Además de los esteroides, están las sustancias esteroisoméricas, las cuales aunque no tienen la estructura policíclica básica del esteroide, proveen algunos de los mismos efectos fisiológicos.

Los esteroides han sido estudiados en forma extensa y se han preparado derivados que han sido enlazados con proteínas antigénicas para la preparación de anticuerpos de los esteroides. Los compuestos ilustrativos incluyen: BSA (albúmina de suero bovino)17beta-estradiol-6-(O-carboximetil-oxima) (Exley y colaboradores, Steroide, 18, 593, (1971); derivado testosteron-3-oxima de la BSA (Midgley y colaboradores, Acta Endocr. 64, suplemento 147, 320 (1970)) y derivado progesteron-3-oxima de BSA (Midgley y colaboradores, ibidem).

En su mayor parte, los esteroides utilizados tendrán la siguiente estructura:





5 en donde X y A tienen la definición expresada anteriormente. Por lo general, la enzima estará enlazada a los anillos A, B o C en las posiciones 2, 3, 4, 6, u 11 o, en la posición 16 o 17 del anillo D o en las cadenas laterales en la posición 17. Los anillos pueden tener diversos substituyentes, en particular grupos metilo, grupos hidroxilo, grupos oxocarbonil, grupos éter y grupos amino. Cualquiera de estos grupos se puede utilizar para enlazar la enzima a la estructura básica del anillo. En su mayor parte, los esteroides de interés tendrán, cuando menos una, por lo general de 1 a 6 y usualmente de 1 a 4 funcionalidades oxígeno, por ejemplo, alcohol, éter, ésteres o ceto. Además, pueden estar presentes substituyentes halo. Los esteroides tendrán, por lo general, de 18 a 27 átomos de carbono.

15 Los anillos pueden tener uno o más sitios de insaturación, sea etilénica o aromática y pueden estar substituidos en posiciones tales como las posiciones 6, 7 y 11 con substituyentes oxígeno. En adición, puede haber grupos metilo en las posiciones 10 y 13. La posición marcada con una Z, 17, puede ser y será variada grandemente, dependiendo del esteroide en particular, Z representa dos grupos monovalentes o un grupo divalente y puede ser un oxígeno

16 SET 1976

5 carbonilo, un grupo hidroxil, un grupo alifático de 1 a 8 átomos de carbono incluyendo un grupo acetil, un grupo hidroxiacetil, carboxi ó carboxialquil de 2 a 6 átomos de carbono, un grupo acetilénico de 2 a 6 átomos de carbono u grupos alquilo o alquilo oxigenado halo-substituidos o, un grupo que tenga más de una funcionalidad, por lo general de 1 a 3 funcionalidades.

10 Para Z puede haber un H o un segundo grupo, en particular hidroxilo; alquil, por ejemplo metilo; hidroxialquilo, por ejemplo hidroximetilo; halo, por ejemplo fluoro o cloro; oxietér y similares.

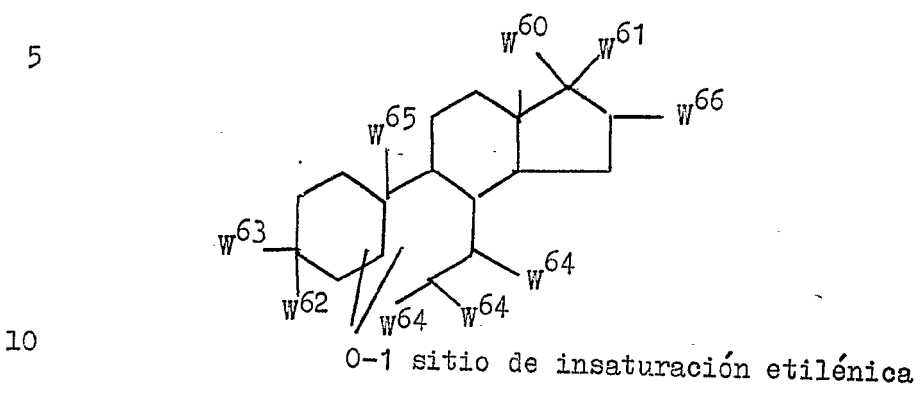
15 Estos esteroides tienen uso como hormonas, masculinas y femeninas (sexuales) las cuales pueden ser divididas en estrógenas, gestógenas y andrógenas, hormonas adrenocorticales, (glucocorticoides), ácidos biliares, glicósidos cardiotónicos y agliconas, así como saponinas y sapogeninas.

20 Las sustancias miméticas de los esteroides, en especial las hormonas sexuales, están ilustradas por el dietilestilbestrol.

25 Las hormonas sexuales de interés pueden ser divididas en dos grupos: hormonas masculinas (andrógenas) y las hormonas femeninas (estrógenas).

16 SET 1974

Los andrógenos que encontrarán uso tendrán la siguiente fórmula:



en donde:

15

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

W^{60} es hidrógeno o hidroxilo;

20

W^{61} es hidrógeno, metilo o hidroxilo (cuando dos grupos enlazados al mismo átomo de carbono son hidroxilo, se entenderá que es oxo);

W^{62} y W^{63} son hidrógeno o hidroxilo, cuando menos uno de W^{60-63} es hidroxilo (ya sea como hidroxilo u oxo);

25

W^{64} es hidrógeno o dos W^{64} pueden ser tomados



16 SEP 1977

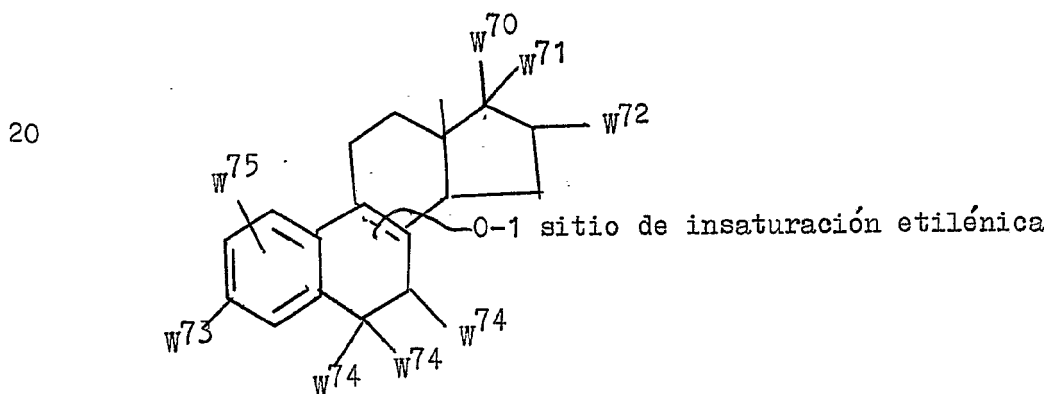
juntos para formar un doble enlace:

W⁶⁵ es metilo y,
W⁶⁶ es hidrógeno.

5 Los compuestos ilustrativos que pueden estar enlazados a una enzima incluyen testosterona, androsterona, isoandrosterona, etiocolanolona, metiltestosterona y dihidroisoandrosterona.

10 Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados con una enzima incluyen B-carboximetoxi-testosteronoimina, carbonato de 17-monotestosteronil, succinato de androsteronil, maleato de testosteronil, O³ carboximetil, O¹⁷-metial-androst-5-eno-3beta; 17beta-diol, testosterona O-carboximetil oxima y carbonato de androsteronil.

15 Los estrógenos tienen un anillo aromático A y en su mayor parte tienen la fórmula



25



16

en donde:

5 cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

W^{70} o W^{71} es hidrógeno, etinilo o hidroxilo (cuando dos hidroxilos están enlazados a los mismos átomos de carbono, se entenderá que es oxo);

W^{72} es hidrógeno o hidroxilo;

10 W^{73} es hidroxilo o alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono;

W^{74} es hidrógeno o dos W^{74} pueden ser tomadas juntos para formar un doble enlace y,

W^{75} es hidrógeno.

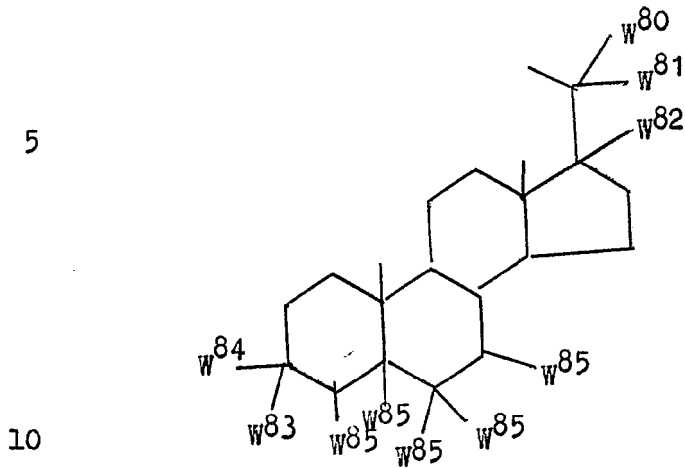
15 Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima son equilenina, beta-estradiol, estrona, estriol y 17-alfa-etinilestradiol.

20 Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima incluyen: 3-carboximetil estradiol, 2-clorometilestrona; glutarato de estrona; aspartato de equilenitrilo; estrona-O-carboximetil oxima y tiocarbamato de equileninil-N-carboximetil.

25 Otra clase de hormonas son las gestógenas



que tienen la siguiente fórmula



en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$
o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reem-
15 plazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá
 $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

W^{80} y W^{81} son hidrógeno o hidroxilo, siendo
cuando menos uno hidroxilo (cuando dos grupos hidro-
xilo están enlazados al mismo átomo de carbono se
20 entenderá que es oxo);

W^{82} es hidrógeno o hidroxilo;

W^{83} y W^{84} son hidrógeno o hidroxilo, siendo
hidroxilo cuando menos uno y,

W^{85} es hidrógeno o dos W^{85} pueden ser tomados
25 juntos para formar un doble enlace.

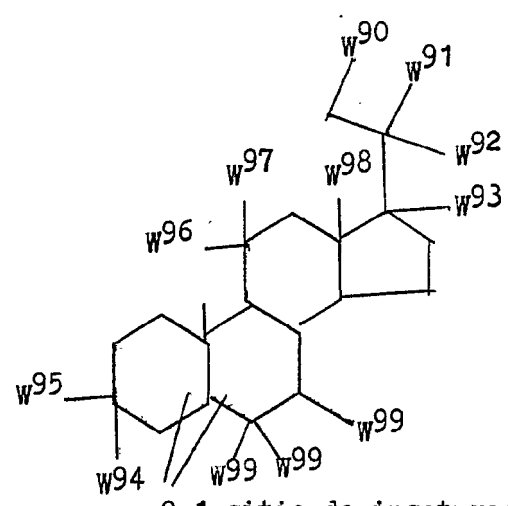


Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima incluyen progesterona, pregnenolona, alopregnano-3a:20a-diol y alopregnano-3a-ol-20-ona.

5 Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados con enzimas incluyen: 20-progesterona O-carboximetil oxima; ácido pregn-4-en-20-on-3-ylidinitilmetilencarboxílico; O-carboximetil progesterona 3-oxima; tartrato de pregnenolonilo; ácido O-pregnenolonil
10 láctico y, alopregnano-3-carboximetil-20-ol.

El siguiente grupo importante de esteroides son los corticosteroides que incluye tanto los minero-corticoides como a los glucocorticoides. Estos compuestos tienen la siguiente fórmula

15



20

25

en donde:

SECRET 1974

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$
o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reem-
plazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá
 $X^{\#}-A^{\#}$ (sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

5 W^{90} es hidrógeno o hidroxilo;
 W^{91} y W^{92} son hidrógeno o hidroxilo, y por lo
menos uno de los cuales es hidroxilo (cuando dos gru-
pos hidroxilo están enlazados con el mismo átomo de
carbono se entenderá oxo);

10 W^{93} es hidrógeno o hidroxilo;
 W^{94} , W^{95} , W^{96} , W^{97} son hidrógeno o hidroxilo y
cuando menos uno de W^{94} y W^{95} es hidroxilo y,
 W^{98} es metilo o formilo;
 W^{99} es hidrógeno o dos de W^{99} pueden ser toma-
15 dos juntos para formar un doble enlace.

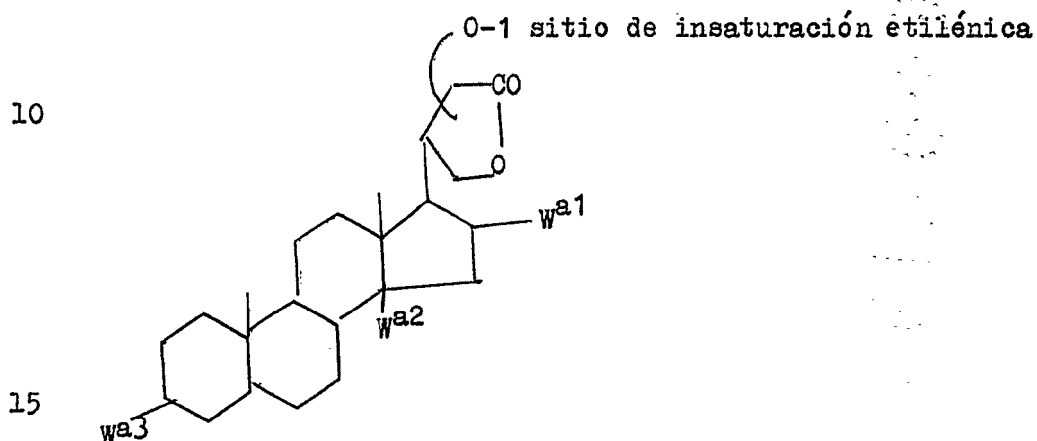
Los compuestos ilustrativos que pueden ser
enlazados a una encima son 17-hidroxi-dioxicorticos-
terona (Compuesto S); deoxicorticosterona; cortisona;
corticosterona; 11-dihidrocortisona (Compuesto F);
20 cortisol; prednisolona y aldosterona.

Los compuestos ilustrativos que pueden ser
enlazados a una enzima incluyen O^{21} -carboximetil
corticosterona; 21-carbamato de N-carboximetil cor-
tisol; succinato de 21-cortisona; succinato de 21-
25 -deoxocorticosterona y O^{17} -metil, O^{21} -carboximetil



cortisona.

Una familia adicional de esteroides son las sapogeninas de las cuales la digital es un miembro importante. El compuesto básico es gitoxigenina, que también se encuentra como el glicósido. Los compuestos de interés tienen la siguiente fórmula:



en donde:

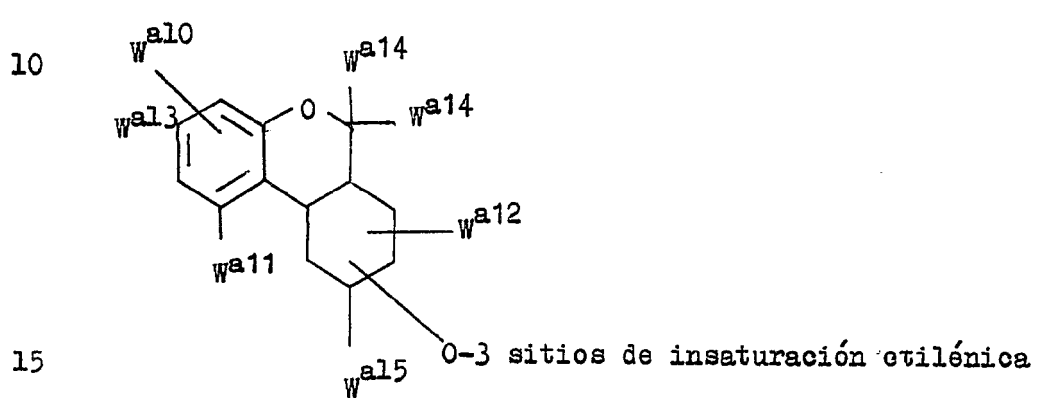
cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

w^{a1} , w^{a2} y w^{a3} son hidrógeno o hidroxilo, usualmente hidroxilo;

25 Marihuana

16 SEP 1974

Debido a su fácil disponibilidad y uso extenso, el tetrahidrocannabinol (el ingrediente activo de la marihuana) y sus congéneres cannabidiol y cannabinol y sus metabolitos son compuestos de gran interés, en donde en método sencillo para el ensayo sería de importancia. Los compuestos que encuentran uso como análogos tienen la siguiente fórmula:



en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

- W^{a10} es hidrógeno o carboxilo;
- W^{a11} es hidroxilo;
- W^{a13} es pentilo;



W^{al4} es hidrógeno, metilo o los dos W^{al4} pueden ser tomados juntos para formar un anillo carbocíclico de 4 a 6 miembros anulares y,

W^{al5} es metilo o carboxilo.

5 Vitaminas

El siguiente grupo de compuestos son las vitaminas. Químicamente, las vitaminas no son una clase química simple, varían grandemente en estructura, pero están clasificadas como un grupo en cuanto a la función. Las vitaminas incluyen vitamina A que es un caroteno; el grupo de vitamina B que incluye riboflavina, tiamina, niacina, piridoxina, ácido pentoténico, biotina, ácido fólico y cianocobalamina (vitamina B_{12}); ácido ascórbico (vitamina C); las vitaminas D que son derivadas de esteroides; tocoferol (vitamina E) y fitil-1,4-naftoquinona (vitamina K).

10
15

Azúcares

El siguiente grupo de compuestos son los azúcares y sacáridos. Los sacáridos son combinaciones de diversos azúcares para formar dímeros, trímeros y polímeros de alto peso molecular denominados polisacáridos.

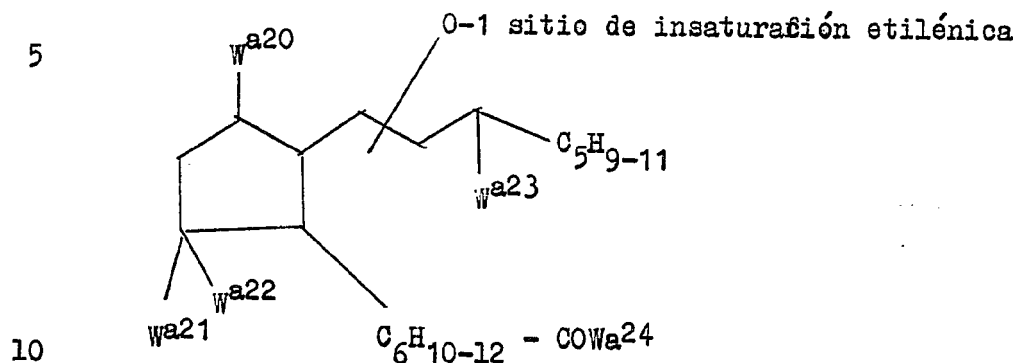
20

Prostaglandina

Otro grupo de compuestos de importancia biológica son las prostaglandinas. Estos compuestos,

25

cuando están enlazados con una enzima tienen, en su mayor parte, la siguiente fórmula



en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

W^{a20} es hidrógeno o hidroxilo;

W^{a21} y W^{a22} son hidrógeno o hidroxilo (Cuando

dos grupos hidroxilo están enlazados a los mismos átomos de carbono, se entenderá oxo);

W^{a23} es hidrógeno o hidroxilo y,

W^{a24} es hidroxilo, amino o un grupo oxi de

1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo alcoxi.

Tranquilizadores

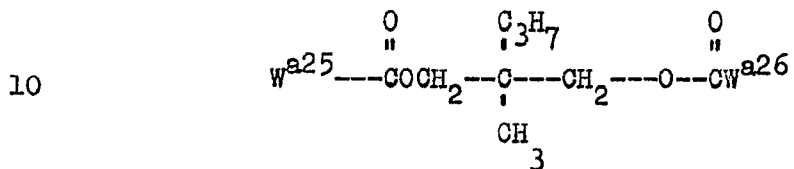
25 Un buen número de compuestos tienen efectos



16 SET 1974

tranquilizadores y debido a su mal uso o abuso proveen oportunidades en donde podría ser útil su determinación.

5 El primer tranquilizador de interés es el Meprobamate, conocido también como Miltown o Equanil. Este compuesto y los análogos relacionados tienen la siguiente fórmula:



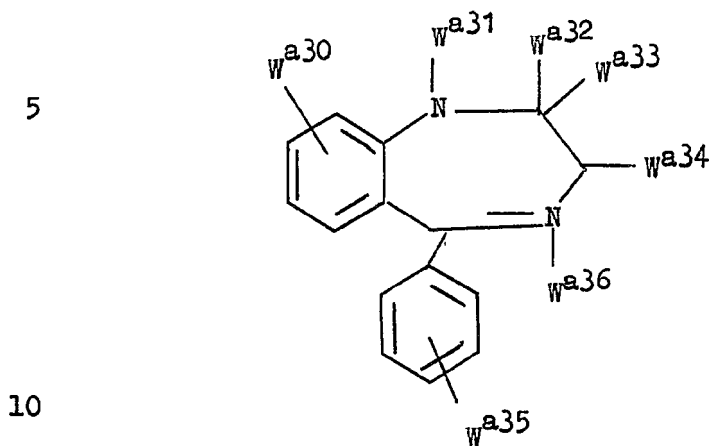
en donde:

15 cualquiera de los grupos W puede ser -X^z-A^z o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por -X^z-A^z. Subsecuentemente se definirá X^z-A^z (Sólo hay un -X^z-A^z por molécula); W^{a25} y W^{a26} son amino.

20 El siguiente grupo de tranquilizadores son los benzodiazocicloheptanos y son conocidos como Librium, Valium, Diazepam u Oxazepam. Estos compuestos y sus análogos relativos tienen la siguiente fór-

25

mula:



en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$
o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reem-
15 plazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá
 $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

W^{a30} y W^{a35} son hidrógeno; W^{a31} es hidrógeno,
alquilo inferior de 1 a 3 átomos de carbono, por
ejemplo metilo o puede ser tomado junto con W^{a32}
20 para formar un doble enlace entre el carbono y el
nitrógeno;

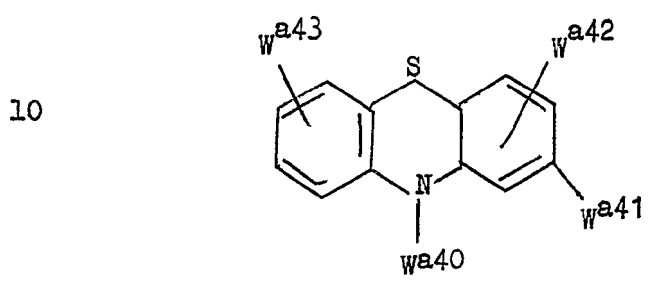
W^{a33} es amino o alquilamino inferior de 1 a 3
átomos de carbono, por ejemplo, metilamino o puede
ser tomado junto con W^{a32} para formar un carbonilo;
25 W^{a34} es hidrógeno o hidroxilo y,

16



W^{a36} es oxígeno o un par de electrones no compartidos.

El siguiente grupo de compuestos son las fenotiazinas, de las cuales es miembro la clorpromazina. Estos compuestos, en su mayor parte, tendrán la siguiente fórmula:



15 en donde:

cualquiera de los grupos W puede ser $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$. Subsecuentemente se definirá $X^{\#}-A^{\#}$ (Sólo hay un $-X^{\#}-A^{\#}$ por molécula);

20 W^{a40} es hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, dialquilaminoalquil de 4 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, 3-(dimetilamino)propil; N-hidroxi alquil (alquilo de 2 a 3 átomos de carbono); N'-piperacinoalquil (alquilo de 2 a 3 átomos de carbono), por ejemplo, N-hidroxietil-N'-piperacinopro-

25

16 SEP 1976

5 pil; N-alquil (alquilo de 1 a 3 átomos de carbono);
N'-piperacinoalquil (alquilo de 2 a 3 átomos de carbono), por ejemplo, N-metil N'-piperacinopropil y, 2-(N-alquil)-piperidinoalquil, en donde el N-alquil tiene de 1 a 3 átomos de carbono y el otro alquilo tiene de 2 a 3 átomos de carbono, por ejemplo, 2-(N-metil)piperidinoetil, habiendo por lo menos dos átomos de carbono entre los heteroátomos;

10 w^{a41} es hidrógeno, cloro, trifluorometilo, alquilmercapto de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo metilmercapto y acilo de 1 a 3 átomos de carbono, por ejemplo, acetilo y, w^{a42} y w^{a43} son hidrógeno.

15 Los compuestos ilustrativos que pueden ser enlazados a una enzima, incluyen clorpromazina, promazina, trifluorpromazina, fluofenazina, tioridazina, perfenazina y porclorperazina.

Misceláneos

20 El grupo final es un grupo de misceláneos que incluye una variedad de medicamentos, drogas y otros productos químicos que tienen uso en aplicaciones médicas, veterinarias y otras.

25 Incluidos en este grupo están los antibióticos tales como penicilina, cloromicetina, actinomicetina y ácidos nucleicos y derivados, tales como



nucleósidos y nucleótidos.

También es de interés la serotonina la cual es 3-(2'-aminoetil)-5-hidroxiindolo. -X²-A² puede estar enlazado en cualquiera de los grupos amino nitro-
5 trogenados o en el grupo hidroxilo.

Por supuesto, muchos de los compuestos que son de interés sufren cambios metabólicos cuando son introducidos en un vertebrado. El fluido fisiológico particular que se esté probando puede tener muy poco,
10 si acaso lo hay, del compuesto original. Por lo tanto, la presencia original del compuesto sólo podría ser detectada como un metabolito. En muchos casos, el metabolito puede ser el clucurónido, ya sea derivado oxi u oxo del compuesto original. En otros casos,
15 el compuesto original puede haber sufrido oxidación, por ejemplo, hidroxilación, reducción, acetilación, desaminación, aminación, metilación o una degradación intensa. Cuando el metabolito todavía retiene una parte substancial de la geometría espacial y po-
20 lar del compuesto original, con frecuencia será posible hacer un análogo de ligando basado ya sea en el compuesto original o en el metabolito. Cuando el metabolito es marcadamente diferente al compuesto original, el análogo de ligando estará basado en el me-
25 tabolito.

16 SEP 1974

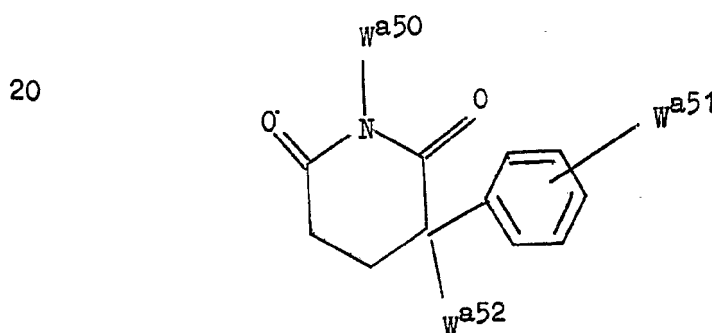
Además de los metabolitos de diversa

drogas, hormonas y otros compuestos previamente descritos, son de interés importante los metabolitos que se relacionan con estados de enfermedad.

5 Como ilustrativos de esos compuestos están la espermina, galactosa, ácido fenilpirúvico y la porfirina Tipo 1, que se creen, sean el diagnóstico de ciertos tumores, galactosemia, fenilcetonuria y púrpura congénita, respectivamente.

10 Dos compuestos de interés que son metabolitos de la epinefrina son el ácido vainillimandélico y el ácido homovainílico. Con estos compuestos, los grupos hidroxilo o carboxilo se pueden usar como el sitio para $-X^{\oplus}-A^{\oplus}$.

15 Otro compuesto de interés es la glutetimida, en la cual el análogo enlazado por enzimas tendrá la siguiente fórmula:



25 en donde:

en donde CV es una célula o virus, X^mOA^m será definido subsecuentemente y m es un número grandemente en exceso de 1, que varía desde cuando menos 100 hasta muchos millares, promediado sobre toda la composición.

5

Como muchos de los materiales biológicamente activos sólo son activos en una forma estereoisómera, debe quedar entendido que se pretende incluir la forma activa o el racemato, cuando el racemato es satisfactorio y se obtiene con facilidad. Los anticuerpos serán específicos para cualquier forma que fuere usada como hapteno.

10

Enzimas (A)

Aunque de acuerdo con el concepto básico de la invención, cualquier enzima podría ser utilizada y acoplada o enlazada con un ligando, en la práctica habrá cierto número de limitaciones prácticas. Sin embargo, debe quedar entendido que, al limitar las enzimas no es cuestión de facilidad de operación sino más bien de minimizar los pasos requeridos para llevar a cabo el ensayo, de maximizar la confiabilidad por ejemplo utilizando las enzimas más estables, que puedan ser almacenadas secas o en solución por largos periodos de tipo, de emplear enzimas que generalmente no sean interferidas ya sea por otras enzimas natura-

20

25



les presentes que compiten por la capa de base u
otras capas de base naturales presentes, que compiten
con la capa de base que está siendo agregada, para
determinar la presencia del ligando. Pocas o ninguna
5 de estas limitaciones son impedimentos insuperables,
como para evitar el uso de una enzima particular. Ade-
más, las enzimas individuales utilizadas variarán de-
pendiendo del ensayo y del fluido en particular que
esté siendo ensayado. Las enzimas hidrolíticas que es-
10 tán presentes en la saliva son de menos preocupación
en la orina. La catalasa que actúa con el peróxido
de hidrógeno es relativamente universal y si se fuere
a utilizar una peroxidasa, cualquier catalasa presen-
te tendría, ya sea, que se desnaturalizada, removida
15 o tenida en cuenta con el empleo de una muestra para
control a fin de lograr máxima exactitud del ensayo.

En casi todos los casos, la presencia de
substancias de interferencia, tales como enzimas o
inhibidores, puede ser tratada con la desactivación
20 o remoción de la substancia o, en el caso de la capa
de base con la destrucción o remoción de la capa de
base o teniéndolo en cuenta para su uso en un control.
En el caso de las enzimas lábiles, aunque no pueden
ser comercializadas fácilmente, un laboratorio inde-
25 pendiente podría prepararlas como composiciones fres-



16 SET. 1974

cas enlazando el ligando a la enzima antes de usarla. La inconveniencia de este método, tendería a minimizar el uso generalizado de tales enzimas.

5 Con algunas enzimas que tengan capas de base se muy pequeñas, tales como la peroxidasa y la catalasa, se pueden encontrar dificultades para inhibir la enzima, cuando el receptor está ligado al ligando enlazado con enzimas. Esto se puede obviar en muchas formas. La primera, se puede proveer una capa de base
10 artificial que tenga altos requerimientos estéricos. La segunda, se puede emplear el marcado por afinidad, de modo que el ligando esté adyacente al sitio reactivo en la enzima. Hasta el grado en que estas modificaciones sean inconvenientes o indeseables, se pueden
15 emplear otras enzimas que tengan las características deseadas.

 Con muchas enzimas y combinaciones de ligandos, se logrará una reducción acrecentada en la eficiencia catalítica de las enzimas teniendo, cuando
20 menos, una capa de base (que incluya la coenzima) involucrada en la reacción de la enzima, con un peso molecular de cuando menos 150, de preferencia de cuando menos 500 y más preferiblemente, de cuando menos 1,000. En algunos casos, el peso molecular será, substancialmente,
25 en exceso de 5,000 por ejemplo con la lisozima



o la celulasa.

Una lista de las enzimas comunes se puede encontrar en Hawk y colaboradores, Practical Physiological Chemistry, McGraw-Hill Book Company, New York (1954), páginas 306 a 307. Esa lista está producida, en total, como sigue, incluyendo la fuente de la enzima, la capa de base y los productos finales. Otras enzimas útiles adicionales se pueden encontrar en Barman, Enzyme Handbook, Springer-Verlag, New York, 1969.

Nombre y Clase	Distribución	Capa de Base	Productos Finales
<u>Hidrolasas, Carbohidrasas</u>			
1. Amilasa	Páncreas, saliva, malta, etc.	Hidratos de carbono, almidón, dextrina, etc.	Maltosa y dextrinas
2. Lactasa	Jugos y mucosa intestinales	Lactosa	Glucosa y galactosa
3. Maltasa	Jugo intestinal, levadura, etc.	Maltosa	Glucosa
4. Sucrasa	Jugo intestinal, levadura, etc.	Sacarosa	Glucosa y fructosa
5. Emulsina	plantas	beta-glucósidos	Glucosa, etc.
<u>Nucleasas</u>			
1. Polinucleotidasa	jugo pancreático, jugo intestinal,	Acido nucléico y derivados	Nucleótidos
2. Nucleotidasa	jugo intestinal y otros tejidos	Nucleótidos	Nucleótidos y acido fosfórico
3. Nucleotidasa	Tejidos animales	Nucleótidos	Hidratos de carbono y bases



16 SET. 1971

<u>Nombre y Clase</u>	<u>Distribución</u>	<u>Capa de Base</u>	<u>Productos Finales</u>
<u>Amidasas</u>			
		Compuestos amino y amidas	
1. Arginasa	Hígado	Arginina	Ornitina y urea
2. Ureasa	bacterias, frijoles de soja, frijoles, etc.	Urea	Bióxido de carbono y amoniaco
3. Glutaminasa	Hígado, etc.	Glutamina	Acido glutámico y amoniaco
4. Transaminasa	Tejidos animales	Acido glutámico y ácido oxalacético, etc.	Acido alfa-cetoglutarico, ácido aspartico, etc.
<u>Deaminasas de Purinas</u>			
		Bases y derivados de purinas	
1. Adenasa	Tejidos animales	Adenina	Hipoxantina y amoniaco
2. Guanasa	Tejidos animales	Guanina	Xantina y amoniaco
<u>Peptidasas</u>			
		Peptidos	
1. Aminopolipeptidasa	Levadura, intestinos, etc.	Polipéptidos	Péptidos más simples y aminoácidos
3. Dipeptidasa	Plantas, tejidos animales y bacterias	Dipéptidos	Aminoácidos
4. Prolinasa	Tejidos animales y levadura	Péptidos de prolina	Prolina y péptidos más simples
<u>Proteinasas</u>			
		Proteínas	
1. Pepsina	Jugo gástrico	Proteínas	Proteosomas, peptonas, etc.
2. Tripsina	Jugo pancreático	Proteínas, proteosomas y peptonas	Polipéptidos y aminoácidos
3. Catepsina	Tejidos animales	Proteínas	Proteosomas y peptonas
4. Renina	Estómago de rros	Caseína	Paracaseína
5. Quimotripsina	Jugo pancreático	Proteínas, proteosomas y peptonas	Polipéptidos y aminoácidos



16 SET. 1974

<u>Nombre y Clase</u>	<u>Distribución</u>	<u>Capa de Base</u>	<u>Productos Finales</u>
6. Papaína	Papaya, otras plantas	Proteínas, proteosas y peptonas	
7. Ficina	Savia del higo	Proteínas	Proteosas, etc.
<u>Esterasas</u>		Esteres	Alcoholes y ácidos
1. Lipasa	Páncreas, semillas de ricino, etc.	Grasas	Glicerol y ácidos grasos
2. Esterasas	Hígado, etc.	Butirato de etilo, etc.	Alcoholes y ácidos
3. Fosfatasas	Plantas y tejidos de animales	Esteres de ácido fosfórico	Fosfato y alcohol
4. Sulfatasas	Tejidos de animales y plantas	Esteres de ácido sulfúrico	Acido sulfúrico y alcohol
5. Colinesterasa	Sangre, tejidos	Acetilcolina	Colina y ácido acético

Enzimas de Hierro

1. Catalasa	Todos los organismos vivos, excepto unas pocas especies de microorganismos	Peróxido de hidrógeno	Agua y oxígeno
2. Citocromo oxidada	Todos los organismos vivos, excepto unas pocas especies de microorganismos	Citocromo C reducido en presencia de oxígeno	Citocromo C oxidado y agua
3. Peroxidasa	Casi todas las células de las plantas	Un gran número de fenoles, aminas aromáticas, etc., en presencia de H_2O_2	Producto de oxidación de la capa de base y agua

Enzimas de cobre

1. Tirosinasa (polifenoloxidasa, monofenoloxidasa)	Plantas y tejidos de animales	Diversos compuestos fenólicos	Producto de oxidación de la capa de base
2. Oxidasa de ácido ascórbico	Tejidos de las plantas	Acido ascórbico en presencia de oxígeno	Acido dihidroascórbico

16 SE 1974

Nombre y Clase Distribución Capa de Base Productos Finales

Enzimas que Contienen Coenzimas I y/o II

- | | | | |
|--|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1. Dehidrogenasa de alcohol | Tejidos de animales y plantas | Alcohol etílico y otros alcoholes | Acetaldehído y otros aldehídos |
| 2. Dehidrogenasa málica | Tejidos de animales y plantas | Acido L(--) málico | Acido oxalacético |
| 3. Dehidrogenasa isocítrica | Tejidos de animales y plantas | Acido L-Isocítrico | Acido oxalosuccínico |
| 4. Dehidrogenasa láctica | Tejidos de animales y levadura | Acido láctico | Acido pirúvico |
| 5. Dehidrogenasa beta-hidroxi-butírica | Hígado, riñones y corazón | Acido L-beta-hidroxi-butírico | Acido acetoacético |
| 6. Dehidrogenasa de glucosa | Tejidos animales | D-Glucosa | Acido D-glucónico |
| 7. Dehidrogenasa de éster de Robison | Eritrocitos y levadura | Ester de Robison (hexona-6-fosfato) | Acido fosfohexónico |
| 8. Dehidrogenasa de glicerofosfato | Tejidos animales | Glicerofosfato | Acido fosfoglicérico |
| 9. Dehidrogenasa de aldehído | Hígado | Aldehídos | Acidos |

Enzimas que Reducen el Citocromoc

- | | | | |
|---|-------------------------------------|-----------------|----------------|
| 1. Dehidrogenasa succínica (como se prepara ordinariamente) | Plantas, animales y microorganismos | Acido succínico | Acido fumárico |
|---|-------------------------------------|-----------------|----------------|

Enzimas Amarillas

- | | | | |
|---------------------------------------|----------|----------------------|--|
| 1. Enzima amarilla antigua de Warburg | Levadura | Coenzima II reducida | Coenzima II oxidada y enzima amarilla reducida |
|---------------------------------------|----------|----------------------|--|



<u>Nombre y Clase</u>	<u>Distribución</u>	<u>Capa de Base</u>	<u>Productos finales</u>
2. Diaforasa	Bacterias, levaduras, plantas mayores y animales	Coenzima I reducida	Coenzima I oxidada y diaforasa amarilla reducida
3. Enzima de Haas	Levadura	Coenzima II reducida	Coenzima II oxidada y enzima amarilla reducida
4. Oxidasa de xantina	Tejidos animales	Hipoxantina, xantina, aldehídos, coenzima I reducida, etc.	Xantina, ácido úrico, ácidos, coenzima I reducida, etc. en presencia de aire, H ₂ O
5. Oxidasa de ácido D-amino	Tejidos animales	D-aminoácidos + O ₂	ácidos alfa-ceto + NH ₃ + H ₂ O
6. Oxidasa de ácido L-amino	Venenos de animales y serpientes	Acidos L-amino	Acidos ceto y amoníaco.
7. TPN-citocromo C reductasa	Hígado, levadura	Coenzima II reducida y citocromo C	Coenzima II oxidada y citocromo C reducido
8. DPN-citocromo C reductasa	Hígado, levadura	Coenzima I reducida y citocromo C	Coenzima I oxidada y citocromo C reducido

Hidrasas

1. Fumarasa	Organismos vivos en general	Acido fumárico + H ₂ O	Acido L-málico
2. Aconitasa	Animales y plantas	Acido cítrico	Acido cis-aconítico y ácido L-isocítrico
3. Enolasa	Tejidos animales y levadura	Acido 2-fosfoglicérico	Acido fosfopirúvico + H ₂ O

Mutasas

1. Glioxalasa	Organismos vivos en general	Metilglioxal y otros glioxales substituidos	Acido D(-)láctico
---------------	-----------------------------	---	-------------------

Desmolosas



16 SET 1976

<u>Nombre y Clase</u>	<u>Distribución</u>	<u>Capa de Base</u>	<u>Productos finales</u>
1. Zimohexasa (aldolasa)	Todas las células	Fructosa-1,6-difosfato	Acido dehidroxiacetofosfórico y ácido fosfoglicérico
2. Carboxilasa	Tejidos de las plantas	Acido pirúvico	Acetaldehído y CO ₂
3. Beta-cetocarboxilasas	Animales, bacterias, plantas	Acidos beta-ceto	Acidos alfa-ceto
4. Decarboxilasas de aminoácidos	Plantas, animales, bacterias	Acidos L-amino	Aminas y CO ₂
5. Anhidrasa carbónica	Eritrocitos	Acido carbónico	CO ₂ + H ₂ O

Otras Enzimas

1. Fosforilasa	Tejidos de animales y plantas	Almidón o glucógeno y fosfato	Glucosa-1-fosfato
2. Fosfohexoisoimerasa	Tejidos de animales y plantas	Glucosa-6-fosfato	Fructosa-5-fosfato
3. Hexoquinasa	Levadura, tejidos animales	Trifosfato de adenosina	Difosfato de adenosina + glucosa-6-fosfato
4. Fosfoglucomutasa	Plantas y animales	glucosa-1-fosfato	Glucosa-6-fosfato

Como ya se indicó, la enzima ideal estaría ausente en los fluidos corporales de interés, tales como orina, saliva y sangre; las capas de base de interferencia estarían ausentes en los antes mencionados fluidos corporales; otras enzimas que compiten por la misma capa de base estarían ausentes en dichos fluidos corporales; la enzima sería estable por largos periodos de tiempo en condiciones normales de almacenamiento, sea



seca o en solución; la enzima emplearía una capa de base o proveería un producto de la capa de base que sería fácilmente detectable y no habría interferencia en la detección de otros productos químicos que pudie-
5 ren estar presentes en los fluidos corporales; tendría una actividad muy elevada; tendría máxima actividad en las mismas condiciones que maximizan su enlace con el receptor y, finalmente, sería inhibida al estar enlazada con el receptor. Estos dos últimos requisitos
10 no son esenciales y se pueden obviar utilizando un sistema heterogéneo.

Los criterios adicionales que no van con la facilidad de operación sino más bien con la factibilidad comercial, son la disponibilidad de una enzima
15 en particular y su costo.

Las enzimas que tienen algunas de las propiedades anteriores son lisozina, peroxidasa de rábano picante, beta-glucuronidasa, dehidrogenasa de malato, amilasa, celulasa, dehidrogenasa de manitol-1-fosfato,
20 fosforilasa, particularmente fosfolipasa C y peroxidasa. Todas estas enzimas sufren de uno o más deficiencias, pero las deficiencias son obviadas con facilidad y las enzimas gozan de un buen número de las propiedades antes indicadas.

25 Grupo de Enlace (X)

El ligando o el análogo del ligando, por lo normal, está enlazado ya sea directamente a la enzima con un enlace sencillo o doble o, de preferencia, a un grupo de enlace. Para los ligandos que son haptenos y cuyos receptores son anticuerpos, el ligando habrá sido enlazado a una proteína con el fin de preparar los anticuerpos. Dado que los anticuerpos reconocerán la parte de la molécula del ligando que se extiende desde la proteína, ordinariamente se utilizará el mismo grupo de enlace que se empleará para enlazar el ligando a la enzima, que el utilizado para enlazar el ligando a la proteína para proveer la sustancia antigénica.

Los grupos funcionales que estarán presentes en la enzima para enlazarse, serán amino (incluyendo guanidino), hidroxilo, carboxi y mercapto. En adición, grupos aromáticos activados pueden servir también como sitio para el enlace.

Los aminoácidos que tienen grupos amino disponibles para el enlace incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos con grupos hidroxilo libres, incluyen serina, hidroxiprolina y treonina. Los aminoácidos que tienen grupos carboxilo libres incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Un aminoácido que tiene un grupo mercapto disponible en la cisteína. Final-

16 SET 1976

mente, los aminopéptidos que tienen anillos aromáticos
activados son tirosina y triptófano.

5 En la mayoría de los casos, el grupo preferido de enlace será el grupo amino. Sin embargo, habrá situaciones con algunas enzimas en donde será preferido uno de los otros grupos de enlace.

10 El ligando, por supuesto, tendrá una gran diversidad de funcionalidades que pueden estar presentes. En adición, como ya se indicó, las funcionalidades que están presentes pueden ser modificadas de modo de formar una funcionalidad diferente, por ejemplo ceto en hidroxilo o una olefina en un aldehído o ácido carboxílico. Para ese fin, la selección de grupos para enlace al ligando puede ser variada con mucha más amplitud que la selección de grupos para enlace al ligando. Sin embargo, en ambos casos, ha sido desarrollada una gran variedad de diferentes tipos de funcionalidades, específicamente para enlazar diversos compuestos con las proteínas y las enzimas en particular.

20 Cuando un grupo de enlace es empleado para enlazar el ligando con la enzima, el procedimiento más frecuente será el de enlazar el grupo de enlace al ligando, para proveer un sitio activo para el enlace con la enzima. Esto se puede lograr en un solo

10
16 SET 1974

paso o puede requerir una pluralidad de pasos sintéticos, incluyendo el bloqueo y desbloqueo de los grupos activos en el ligando, aparte del involucrado en la provisión del grupo de enlace. Los grupos de enlace
5 que se mencionan más adelante, están relacionados tan sólo con un enlace de puente de la enzima y el ligando.

Cuando se utiliza un grupo de enlace, normalmente habrán de un átomo a 14 átomos en la cadena y,
10 más usualmente, de dos átomos a 8 átomos en la cadena que enlaza el ligando a la enzima. Cuando están involucradas estructuras cíclicas, la estructura cíclica será igualada con el número de átomos que proveen una longitud similar a la cadena.

15 El grupo de enlace, (excluyendo los átomos derivados del ligando y la enzima), cuando está involucrado un enlace que no sea directo, será desde 1 hasta alrededor de 30 átomos (carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre) y por lo general
20 4 a 20 átomos.

Preferiblemente, el grupo de enlace será por lo general desde cero hasta 14 átomos de carbono, más usualmente de 1 a 8 átomos de carbono y de uno a 8 heteroátomos, por lo general uno a 6 heteroátomos, los
25 cuales son oxígeno, azufre y nitrógeno, por lo común



1974

oxígeno y nitrógeno. Las funcionalidades preferidas presentes en el grupo de enlace son nonoxocarbonil o tiocarbonil, amino o hidroxil.

5 Un grupo de grupos de enlace que ha sido encontrado particularmente útil con una amplia gama de ligandos, tienen desde 2 a 4 átomos de carbono y tienen de 1 a 2 funcionalidades que no son oxocarbonil. Estas son derivados de los anhídridos cíclicos y de los ácidos α -halocarboxílicos. Otro grupo de enlace tiene 10 de 2 a 4 átomos de carbono y de 1 a 2 heteroátomos en la cadena, teniendo un total de 1 a 4 heteroátomos. Este grupo está ilustrado por un grupo de enlace derivado de la O-carboximetil hidroxilamina.

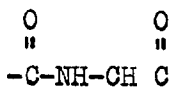
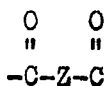
15 La siguiente tabulación indica varios grupos de enlace, que varían con las funcionalidades presentes en el ligando y en la enzima. Excepto lo indicado, el grupo de enlace satisface una a 2 valencias en los grupos funcionales del ligando y la enzima a los cuales está enlazado.

20	<u>Ligando</u>	<u>Enzima</u>
	amino (-NH) o hidroxilo (-OH)	amino (-NH ₂). hidroxilo (-OH) o mercapto (-SH)

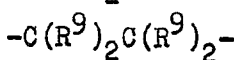
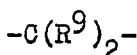
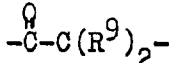
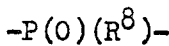
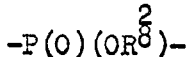




16 SET 1974

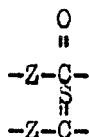


5

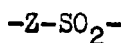


10

(sólo amino primario)



15



20

Enlace Z: hidrocarbilenos de 1 a 10 átomos de carbono, más específicamente alquileno de 1 a 6 átomos de carbono; alquenileno de 2 a 6 átomos de carbono; alquinileno de 2 a 10 átomos de carbono; cicloalquileno de 4 a 10 átomos de carbono y arileno de 6 a 10 átomos de carbono; oxaalquileno de 4 a 8 átomos de carbono y azaalquileno de 4 a 8 átomos de carbono;

25

R^8 alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

R^9 hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de

carbono;

16 SEP 1974

Se prefieren Z o nonoxocarbonilo para en-
 lazarlos con hidroxilo, mientras que con amino, se
 prefieren nonoxocarbonilo, nonoxotiocarbonilo y Z.

	<u>Ligando</u>	<u>Enzima</u>
5	oxocarbonilo ($>C=O$)	amino ($-NH_2$), hidroxilo ($-OH$), o mercapto ($-SH$)
		=NOZ-
		=NOZ-CO-
		=NO ₂ CZCO
10		=CHCO-
		=NNHZ-CO-
		=NNHZ-CS-

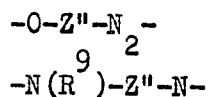
	<u>Ligando</u>	<u>Enzima</u>
15	nonoxocarbonilo ($-C-\overset{O}{\parallel}$)	amino ($-NH_2$), hidroxilo ($-OH$), o mercapto ($+SH$)
		-O-Z-CO-
		-N(R ⁹)-Z-CO-
		-N(R ⁹)-Z-
		-O-Z-

	<u>Ligando</u>	<u>Enzima</u>
20	arilamino ($-Z^aNH_2$)	metina ($\bar{C}H$) amino ($-NH_2$)
		=N-

	<u>Ligando</u>	<u>Enzima</u>
	amino ($-NH_2$); hidroxilo ($-OH$)	metina ($\bar{C}H$)
25	nonoxocarbonilo ($>C=O$)	amino ($-NH_2$)



16 SET 1974



Z'': arileno de 6 a 10 átomos de carbono

5 Cuando la enzima va a ser enlazada a través de un grupo carboxilo del ligando o un grupo de enlace enlazado al ligando, se prepararán ya sean ésteres o amidas. El ligando puede ser enlazado a cualquiera de los grupos de enlace que sean apropiados para proveer un enlace entre el ligando y el grupo alcohol o amino de la enzima, para formar el grupo éster o amida, respectivamente. Cuando la enzima tiene un anillo aromático activado, el ligando puede ser enlazado a una sal de diazonio aromática para proveer el puente deseado.

15 El grupo de enlace puede ser seleccionado de acuerdo con las siguientes consideraciones. Los enlaces formados deben ser estables en las condiciones del ensayo. Cuando se enlaza el ligando a través del grupo de enlace con la enzima, la enzima debe retener, cuando menos, una parte de su actividad al ser aislada. La enzima no debe evitar el enlace del ligando con el receptor, Las funcionalidades deben permitir cierta selectividad, de modo que el enlace pueda ser dirigido a grupos o tipos de grupos específicos tanto en los ligandos como en las enzimas.



Se consideran valiosas unas cuantas ilustraciones de la forma en la cual pueden ser introducidos los grupos de enlace. Por ejemplo, si el ligando tiene un grupo amino, el amino puede ser enlazado con cloroacetato etílico para formar la capa de base-N glicinato etílico. El éster puede ser hidrolizado y se forma el anhídrido mixto de ácido carboxílico. Luego, el anhídrido mixto puede ser utilizado para formar un grupo carboxamida con un aminoácido de una enzima que tenga un grupo amino libre, por ejemplo lisina.

Si el ligando tiene un grupo ceto, el carbonilo puede ser condensado directamente con un grupo amino de la enzima o la O-carboximetiloxima puede ser preparada con O-carboximetilhidroxilamina. En la misma forma, el éster puede ser hidrolizado y formarse un anhídrido mixto, el cual luego puede ser utilizado para formar la carboxamida con lisina.

Cuando está presente un grupo carboxilo en el ligando, puede ser conveniente hacer reaccionar el grupo carboxi para formar la monoamida de fenildenediamina. Luego, el compuesto resultante puede ser diazotizado para formar la sal diazo, la cual puede ser acoplada con la tirosina presente en la enzima.

Otra manera de formar el grupo de enlace se-

16 SEP 1974

ría la de hacer que un alcohol de un ligando reaccio-
nase con anhídrido succínico para formar el monoéster.
Luego, el grupo carboxi libre puede ser activo median-
te la preparación del anhídrido mixto y puede ser usa-
do para la reacción con una amina en la enzima.

Con un grupo amino presente en el ligando,
este puede ser hecho reaccionar con anhídrido maleíco
en condiciones forzadas para preparar la maleimida.
Luego, la maleimida puede ser combinada con cisteína
en la enzima para proveer, mediante una adición de
Michael, la 3-tiosuccinimida.

Para ligandos polifuncionalizados tales co-
mo proteínas, se requerirán reactivos bifuncionales
que se pueden emplear con mezclas del ligando y la
enzima. Por ejemplo, la bis-(4-fluoro-3-nitro)sulfona
se enlazaría a los grupos amino de la lista para dar
ligando y enzima puenteadas por un grupo de enlace
bis-(4-amino-3-nitro)sulfona.

Aunque en su mayor parte la enzima puede ser
enlazada en cualquier posición conveniente del ligando,
ya sea mediante una funcionalidad presente en forma
natural en el ligando o una introducida en forma sin-
tética, hay métodos preferidos para enlazar la enzima
al ligando. Primero, se debe reconocer que el ligando
del ligando enlazado por enzima no necesita tener nin-



guna actividad biológica. Uno se preocupa principalmente por no alterar las relaciones de geometría y de sitios polares de una parte substancial de la molécula del ligando. Cuando el ligando es un hapteno, entonces la enzima estará normalmente enlazada en el mismo sitio que se empleó para fijarla a la proteína en la preparación del antígeno. Cuando el ligando es un antígeno intacto, se puede emplear varios sitios para fijación a una o más moléculas de enzima, con la limitación obvia de que el número de moléculas de enzima no debe ser tan grande como para evitar el enlace con el anticuerpo. Cuando el ligando tiene un receptor natural que no sea un anticuerpo, el o los puntos de sujeción serán también determinados, en forma principal, por la necesidad de mantener un fuerte enlace con el receptor.

Además, si se está tratando de ensayar una de una variedad de moléculas que son muy similares, por ejemplo, los esteroides, pero que difieren en sus substituyentes en la posición 17, se elegiría marcar la molécula con la enzima en un sitio distante a la funcionalidad distintiva. Siguiendo con la analogía del esteroide, frecuentemente sería preferible enlazar en la posición 3, en vez de la posición 17, dado que la parte distintiva de la molécula está,

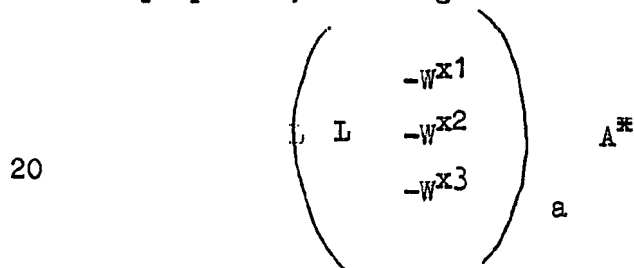
16 SET 1974

por lo general, en la posición 17. En su mayor parte, la posición 3 es, ya sea, un alcohol o una cetona y la cetona está asociada normalmente con insaturación alifática.

5 Esta misma consideración o una similar estará presente con otros ligandos. Por ejemplo, con un polipéptido, que tiene un sitio receptor natural, se preferiría enlazar lejos del sitio receptor.

10 Como se indicó antes, las fórmulas anteriores indican que solamente hay un ligando enlazado con una enzima A. De hecho, como ya se indicó, excepto cuando se emplea el marcado por afinidad o cuando la enzima sólo necesita ser ligeramente substituida para lograr una reducción en la eficiencia catalítica, el número
15 de ligandos enlazados a la enzima será mayor de uno.

Las fórmulas deben ser expresadas, con más propiedad, como sigue:



25 en donde uno de $Wx1$, $Wx2$ y $Wx3$ es un grupo de enlace, $X^{\#}$, siendo el otro hidrógeno o una funcionalidad apropiada;

16 JUN 1974

L es el ligando;

a es uno o mayor e igual al número de ligandos L enlazados a la enzima Aⁿ. Por lo tanto, las fórmulas precedentes pueden ser modificadas de acuerdo con lo anterior para indicar de manera específica la pluralidad de ligandos enlazados con una enzima. La gama de ligandos a enzimas ya ha sido indicada previamente. Con la mayoría de los ligandos indicados por las fórmulas (excepto los polipéptidos y proteínas), a será, por lo general de 1 a 40, más generalmente de 1 a 35 y cuando la enzima está substituida al azar tendrá por lo general un promedio de 2 a 35.

Enlace del Ligando al Soporte

Para enlazar los ligandos al soporte, se pueden emplear técnicas similares a las utilizadas para enlazar ligandos a las enzimas. Los soportes pueden tener las mismas funcionalidades presentes en las enzimas, tales como grupos carboxi, amino o hidroxí, los cuales pueden ser utilizados como grupos para la fijación. Se pueden emplear los mismos tipos de grupos de enlace o de enlace directo, como los empleados para enlazarlos con las enzimas. Las enzimas pueden ser enlazadas a los soportes de acuerdo con procedimientos conocidos.

16 SET 1974

Ensayo de las Enzimas

Pasando ahora a una consideración de la determinación de la cantidad de enzima activa, los ensayos de la actividad enzimática están bien definidos y establecidos para una amplia variedad de enzimas. Ha sido determinada una amplia diversidad de medios, condiciones y capas de base para medir la actividad enzimática. Ver por ejemplo: Bergmeyer, Methods for Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1965. Dado que existen diferencias, no sólo entre los ensayos para diferentes enzimas, sino incluso en la variedad de ensayos para una enzima en particular, no se puede dar una descripción general de las técnicas para el ensayo.

15 Receptor

En la presente invención, en su mayor parte, los receptores serán macromoléculas que tienen sitios que reconocen estructuras específicas. El reconocimiento de las estructuras específicas estará basado en las fuerzas de van der Waals, las cuales proveen un ambiente espacial específico que maximiza las fuerzas de van der Waals; las interacciones dipolares, sean por dipolos permanentes o inducidos; enlace hidrógeno y iónico; enlace coordinado divalente y enlace hidrófobo. Para un comentario detallado

16 SET 1974

de los mecanismos mediante los cuales los receptores enlazan con los ligandos, ver Goldstein y colaboradores, Principales of Drug Action, Harper and Rowe, New York, 1968.

5 Las macromoléculas de mayor interés son las proteínas y ácidos nucleicos que se encuentran en las membranas celulares, sangre y otros fluidos biológicos. Estos compuestos incluyen enzimas, anticuerpos, ácido ribonucleico (ANR) y ácido desoxirribonucleico (AND) y receptores naturales.

10 Los grupos de proteínas más convenientes para usarse en la presente invención, son los anticuerpos. Estos materiales se usan convenientemente en el análisis de la categoría de ligandos denominados haptenos. Los anticuerpos se producen introduciendo una sustancia inmunogénica en la corriente sanguínea de un animal vivo. La respuesta a la introducción de la sustancia inmunógena para antígeno es la producción de anticuerpos que actúan para cubrir el antígeno y destoxificarlo o precipitarlo de la solución. La proteína forma un recubrimiento que está dispuesto de manera geométrica de modo de hacer que el antígeno se adapte a la disposición espacial de la proteína. Esto puede compararse con una cerradura y una llave. La interacción es normal-

16 SET. 1974

mente reversible en que el antígeno está sujeto a desplazamiento o remoción por diversos medios, sin destruir el sitio receptor.

5 Hay muchos materiales que son antígenos y producirán una respuesta inmunógena al ser introducidos en la corriente sanguínea de un vertebrado. Sin embargo, un buen número de materiales de interés no son antígenos, sino que son haptenos y en esa situación se requiere un paso adicional en la
10 preparación del anticuerpo. Este método de preparar anticuerpos son materiales que no sean antígenos es bien conocido y se puede encontrar en Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Rowe, 1969, Ver también: Landsteiner, Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, N.Y. 1962; Ka-
15 bat y colaboradores, Experimental Immunochemistry, Charlew C. Thomas, Springfield, Illinois, 1967 y, Williams y colaboradores, Methods in Immunology and
20 Immunology, Vol. I; Academic Press, New York, 1967.

El material que va a ser ensayado es enlazado a una proteína por cualquier medio conveniente y la proteína modificada es introducida en el torrente sanguíneo. Se puede emplear el mismo tipo de
25 grupos de enlace utilizados para enlazar la enzima



16 SET 1974

con el ligando. Los anticuerpos que se forman incluirán grupos de anticuerpos que están conformados para ajustar en la mitad extraña enlazada en la proteína. Por lo tanto, se obtienen anticuerpos que son
5 específicos al compuesto o mitad enlazados a la proteína. Mediante técnicas cuidadosas para la separación, los anticuerpos relacionados principalmente con la mitad en cuestión, pueden ser concentrados de modo de proveer una composición de anticuerpos
10 que esté relacionada primariamente con la mitad específica que fue enlazada a la proteína.

Para ilustrar este método, se diazotiza para-aminobencenoarsonato para formar la sal diazo. Combinando la sal diazo con globulina de conejo, la
15 globulina del conejo puede ser marcada con para-azobencenoarsonato. Al introducir esta composición en el torrente sanguíneo de un animal que no sea un conejo, por ejemplo, una oveja, se pueden formar anticuerpos que tendrán una disposición espacial que
20 aceptará tan solo al arsonato de azobenceno.

Además de los anticuerpos, hay un buen número de receptores naturales que son específicos a compuestos de interés biológico. Los compuestos para los cuales los receptores son naturales, incluyen
25 tiroxina, corticosterona, cortisona, 11-desoxicorti-


16 SEP 1974

sol, 11-hidroxiprogesterona, estrógeno, insulina y
angiotensina. Ver, por ejemplo, Vonderhaar y colabo-
radores, Biochem. Biophysics Acta., 176, 626 (1969).
5 Todos estos ligandos han sido estudiados y se ha in-
formado sobre ellos en la literatura, en relación
con estudios sobre su enlace con receptores específi-
cos.

Si se desea, los anticuerpos pueden estar
enlazados a una variedad de soportes. El enlace se
10 puede llevar a cabo en forma similar a la empleada
para ligar la proteína al ligando. Los diversos so-
portes incluyen poliacrilamidas, copolímeros de ace-
tate de vinilo y ácido acrílico, ésteres poliviníli-
cos, celulosa modificada por ejemplo, agarosa y se-
15 farosa, etc. Como alternativa, según se indica antes,
el receptor puede estar enlazado indirectamente a un
soporte. Con anticuerpos que tienen dos sitios recep-
tores, el ligando para el anticuerpo puede estar en-
lazado a un soporte que tenga poros grandes. En es-
20 ta forma, uno de los sitios del anticuerpo estaría
enlazado al ligando enlazado al soporte, dejando el
otro sitio libre para el ensayo. Este método tiene
la ventaja de concentrar los anticuerpos que son es-
pecíficos para el ligando, libres de otras proteínas
25 que estén presentes en el antisuero.

16 SEP 1974

Experimental

Los siguientes ejemplos se presentan a título de ilustración y no de limitación.

EJEMPLO A: Preparación de Anticuerpos de Morfina y Ligado al Soporte

1. Morfina (900 mg.) fue secada durante 4 horas a 50°C., bajo 0.01 mm. de Hg. La morfina seca fue disuelta en 18 ml.

Tabla I

<u>Ligando</u>	<u>Receptor para Referencia del Ligando</u>	<u>Estructura del Ligando</u>
Tiroxina	Globulina para Enlazar Tiroxina (TBG) Prealbumina para Enlazar Tiroxina (TBA) B.E.P. Murphy, C.J.J. Pattee, J. Clin. Endocr., 24, 187 (1964)	<p>Tiroxina</p>
Corticostero- na	Proteína de Núcleos de Células Cerebrales B. McEwen, L. Flapinger Nat. 226, 263 (1970)	<p>Corticostero-na</p>
Cortisol (R=OH,H) Cortisona (R=O) 11-disexi- cortisol (R-H,H)	B.E. Murphy, J.Clin. Endocr., 28, 343 (1968), 27, 973 (1967) Globulina para Enlazar Corticosteroides (Transcortin)	<p>Cortisona</p>
Estradiol	Sitio Receptor para Estrógeno del Utero, BBA, 176, 626 (1969)	<p>Estradiol</p>

16 SEP 1974

de etanol absoluto y se agregaron 125 mg. de hidróxi-
do de sodio, seguido por la adición de 350 mg. de
cloroacetato sódico seco. Después de purgar con nitró-
geno, la solución fue agitada y refluida durante 4
5 horas. La solución caliente fue tratada con 3.8 ml.
de cloruro etanólico de hidrógeno (0.85M) y luego fil-
trada mientras todavía estaba templada. Al dejarla
enfriar toda la noche, se formó un precipitado que fue
recogido y recristalizado a partir de etanol/agua. Al
10 efectuar la adición de éter al filtrado original, se
obtuvo un precipitado adicional el cual también fue
recristalizado a partir de etanol/agua. Rendimiento
total: 600 mg. (55%). Al calentar este producto a
75°C bajo vacío, hubo una pérdida de peso correspon-
15 diente a 0.48 molécula de etanol o 1.15 molécula de
agua. El compuesto seco se descompone a 190-220°C.
(depende del régimen de calentamiento).

Análisis: $C_{19}H_{21}NO_5$; % Teór: C, 66.45; H, 6.16; N, 4.08
% Hallado: C, 65.87; H, 6.98; N, 4.09,

20 4.07

NMR (C_5D_5N) 2.44 ppm ($-CH_3$), 5.08 ppm ($-CH_2COO$)

2. Carboximetilmorfina (240 mg) suspendida en 8
ml de dimetilformamida seca (DMF) fue enfriada a
-15°C., y tratada con 84 microlitros de isobutilclo-
25 roformato. El sólido se disolvió mientras era agitado

16 SET 1974

5 durante 30 minutos a -15°C. Albúmina de suero bovino (BSA) (400 mg.) disuelta en 56 ml. de agua que contenía 2.6 gramos de bicarbonato de sodio fue agregada a esta solución y la mezcla fue mantenida a 0°C., toda la noche. Luego, fue dializada contra agua destilada con cuatro cambios de agua (diálisis 1:80) y liofilizada para dar 350 mg. de conjugado:

Concentración de hapteno en la proteína:

10

$$\begin{array}{ll} \text{MW}_{\text{CMM}} = 327 & \epsilon_{\text{CMM}}^{280} = 1070 \\ \text{MW}_{\text{BSA}} = 64,400 & \epsilon_{\text{BSA}}^{280} = 41600 \end{array}$$

15 El espectro ultravioleta fue medido a 280 nm. en una celda de 1 cm: d=0.59 cuando la concentración fue de 0.287 gramos/litro en agua. El grado de conjugación se puede determinar con los datos anteriores y la fórmula

$$d = \frac{(X\epsilon_{\text{CMM}} + \epsilon_{\text{BSA}})W}{X\text{MW}_{\text{CMM}} + \text{MW}_{\text{BSA}}}$$

20 en donde X= número de haptenos por molécula, W=peso del conjugado de proteína por litro y MW es el peso molecular en donde CMM se refiere al hapteno carboximetilmorfina y BSA se refiere a la proteína.

25 X - 46.6 haptenos/molécula



3. Los antisueros se pueden obtener como sigue: El antígeno (hapteno enlazado con una proteína apropiada, como en el ejemplo anterior) es preparado en una solución salina (9 gramos/litro) a una concentración de 2 mg./ml. Por cada alícuota de 1.0 ml. de la solución anterior introducida, se introducen simultáneamente 2 ml. del "Complete Freund's Adjuvant" en forma homogeneizada por medio de una aguja de dos vías. Para inyecciones subcutáneas, se inyectan aproximadamente 0.3 ml. (antígeno + solución de Freund) por sitio y para inyecciones intraperitoneales, se inyectan aproximadamente 0.4 ml. La dosis total es de alrededor de 4.0 ml. por conejo.

Después de 3 a 4 semanas se aplica una inyección de sostenimiento, intramuscular, consistente en 0.5 ml. de la solución salina anterior y 0.5 ml. del "Complete Freund's Adjuvant": Se deja pasar un periodo de 5 a 7 días y se sangra el conejo introduciendo una aguja de jeringa en el costillar y oprimiendo lentamente hacia el centro, mientras se aplica vacío a la jeringa.

Cuando se ha recogido la cantidad deseada de sangre, se deja coagular la sangre y se retira el coágulo. Luego, la solución restante es centrifugada a 2,000 R.P.M. durante 10 minutos. El suero es recogida



16 SET 1974

go libre de células rojas sueltas.

5 Se agrega al suero gota a gota un volumen
igual de solución saturada de sulfato de amonio, con
agitación, a 4°C. Después de reposar una hora a esa
temperatura, la solución es centrifugada a 10,000
R.P.M. durante 15 minutos y se retira el sobrenadante.
El residuo es suspendido en un volumen lo más pequeño
que se pueda de 1 X BB (amortiguador de borato
cuya descripción aparece más adelante), transferido
10 a una bolsa para diálisis y dializado toda la noche
contra BB de pH 8.0. Luego, el residuo que hay en la
bolsa para diálisis es aislado y congelado.

(Para hacer el amortiguador de borato, se
disuelven 24.6 gramos de ácido bórico en agua, se
15 ajusta el pH con hidróxido de sodio a pH 7.9-8.0,
se agrega 0.1 gramo de azida de sodio y 0.01 gramo de
etilmercuritiosalicilato y se lleva el volumen total
a un litro).

4. En 20 ml. de dimetilformamida se introdu-
cen 400 mg. de aminoetil-Bio-Gel P-300 y 300 mg. de
20 carboximetilmorfina (Ver Ejemplo A-1) y se agrega 1
gramo de bicarbonato de sodio. Después de agitar la
suspensión durante dos días a 4°C., la suspensión es
filtrada, se lava el residuo con agua hasta que los
25 resultantes del lavado están neutros y el residuo es



1976

secado bajo vacío.

El producto resultante, después, es suspen-
dido en 20 ml. de suero de conejo que contenga anti-
cuerpos de morfina y es agitado durante 4 horas a 4°C.
5 La filtración da un residuo que es vuelto a suspender
en 5 ml. de amortiguador de ftalato, pH 3.8 (0.1 M)
y es agitado durante 2 horas. El gel es separado por
centrifugación y el líquido sobrenadante es dializado
contra amortiguador de fosfato, pH 7.4 (0.1 M) para
10 dar una solución amortiguada de anticuerpos substan-
cialmente puros.

5. En un matraz fueron combinados 5 ml. de
suspensión de Sefarosa 4B, 5 ml. de agua y 5 ml. de
una solución de 100 mg/ml. de CNBr y se ajustó el pH
15 a 11.5 con NaOH 4N. Mientras se agitaba la mezcla se
midió el pH y fue mantenido a 11-11.5 con NaOH 4N has-
ta que no se observó cambio adicional en el pH. La
mezcla fue filtrada y lavada con 100 ml. de amortigua-
dor de carbonato 0.1 M. pH 9.0.

20 Los anticuerpos de morfina fueron tratados
previamente pasando 3 ml. de los anticuerpos a lo lar-
go de una columna de 10 x 0.9 cms. de Sephadex G-25
equilibrada contra carbonato 0.1M, pH 9.0. El elute
fue de 4 ml.

25 La sefarosa preparada como se indica fue sus-



16 SET 1974

pendida en 5 ml. de amortiguador de carbonato (frío)
y agregada a la solución de anticuerpos de morfina.
La mezcla fue agitada durante 36 horas a 4°C, filtra-
da y lavada con 100 ml. de amortiguador de carbonato
5 0.1M, pH 9. El análisis ultravioleta mostró que el 65%
de la proteína estaba ligada a la Sefarosa.

6. Los sitios receptores pueden ser determi-
nados como sigue: La actividad enzimática de una so-
lución que contenga ligando enlazado por enzimas se
10 determina de acuerdo con los métodos normales. Se agre-
ga anticuerpo para el ligando hasta que ya no hay
más cambio en la actividad enzimática con adiciones
de anticuerpo. Esto determina la actividad residual
con, substancialmente, todo el ligando enlazado por en-
15 zimas enlazado al anticuerpo.

Se provee una segunda solución de anticuer-
pos y ligando enlazado por enzimas agregada sucesiva-
mente y la actividad enzimática es vigilada después
de cada adición. La actividad enzimática es trazada
20 contra la cantidad de ligando enlazado por enzimas
que se agregó. En efecto, el anticuerpo está siendo
titulado con el ligando enlazado por enzimas. En algún
punto, substancialmente todos los sitios receptores
estarán llenos y se obtendrá una relación en línea
25 recta entre el aumento en la actividad enzimática y la



cantidad de ligando enlazado por enzimas que se agregó. Extrapolando la parte de línea recta hasta la abscisa, se obtiene el número efectivo de sitios de anticuerpos para inhibir el ligando enlazado por enzimas. Al aumentar el número efectivo con el porcentaje de actividad residual, se obtiene una estrecha aproximación del número absoluto de sitios para anticuerpos.

El método anterior se puede usar con cualquier receptor cuando hay una inhibición substancial de la enzima, cuando el ligando enlazado por enzima está enlazado al receptor. Cuando la enzima no está inhibida, entonces se pueden usar formas alternativas, que se reportan en la literatura. Ver también la Solicitud copendiente Serie No. 105.535 presentada el 11 de Enero de 1.971.

EJEMPLO I: Conjugación de Morfina con Amilasa

A. A una solución de 100 mg. de amilasa en 15 ml. de agua que contenga 600 mg. de bicarbonato de sodio se agregaron $4.6 \times 10^{-2} M$ del anhídrido mixto de morfina (preparado como se describe en el Ejemplo A.2) en 1 ml. de dimetilformamida a 0-5°C. La solución fue agitada a 0°C., durante 18 horas, transferida a una bolsa para diálisis y dializada contra agua durante 2 días a 0°. El residuo fue liofilizado a un

16 SET 1974

sólido blanco.

La actividad de la amilasa modificada con morfina fue determinada como sigue: La amilasa modificada con morfina fue mezclada con una suspensión a 37°C. de amilosa teñida. Después de un tiempo arbitrario, la reacción fue suspendida por enfriamiento, centrífugada y el líquido sobrenadante fue transferido a una cubeta y se midió la densidad óptica. Esto se repitió un buen número de veces de modo que la densidad óptica pudiera ser trazada versus el tiempo para dar una gráfica lineal. El declive de la línea indicó la actividad enzimática. Se encontró que la modificación de la amilasa con morfina tuvo poco o ningún efecto sobre la actividad enzimática de la amilasa de partida.

B. Una cantidad medida de antisuero de morfina (concentración de sitios activos igual a $2 \times 10^{-7}M$ por litro) fue agregada a una solución al $6.4 \times 10^{-8}M$ /litro de amilasa modificada por carboximetilmorfina. La prueba de la actividad de la amilasa, después, fue llevada a cabo a 37°C. por un tiempo total de 20 minutos. La siguiente tabla indica los resultados:

16 SET 1977



Determinación	Volumen de Amilasa modificada por metilmorfina, mml	Volumen de Solución de Anticuerpo, ml.	Densidad óptica	
	1	100	0.0	0.910
	2	100	0.020	0.720
5	3	100	0.050	0.560
	4	100	0.100	0.450
	5	100	0.150	0.390

La tabla anterior muestra que, con una concentración creciente de anticuerpo, hay una actividad decreciente de la amilasa modificada por carboximetilmorfina.

C. El efecto de la adición de codeína fue determinado haciendo una corrida con una muestra que contenía anticuerpo y carboximetilmorfina en ausencia de codeína y una muestra en presencia de codeína.

Con 0.2 ml. de una solución que contenía complejo de enzima modificada con anticuerpo-carboximetilmorfina empleado en la determinación de amilasa la densidad óptica resultante de 0.450. Sin embargo, cuando se agregaron 0.030 ml. de una solución de codeína $10^{-7}M$ a la misma cantidad de complejo anticuerpo-enzima, la densidad óptica resultante en el ensayo de la amilasa fue de 0.580. En esta forma, pudo ser ensayada una solución que contenía $10^{-7}M$ de codeína, cuando sólo estuvieron disponibles 30 microlitros. Sin embargo, esto no pretende indicar que esta es la con-

16 SEP 1974

centración mínima requerida, sino más bien que se puede emplear con éxito. El método anterior también se puede emplear con morfina, glucurónido de morfina así como con otros análogos estructurales allegados de morfina y codeína.

5

EJEMPLO II-Conjugación de Morfina con Peroxidasa o

Lisozima

A. (1) a 10 mg. (2.5×10^{-7} M) de peroxidasa de rábano picante (3400 I.U./mg) y 20 mg. de NaHCO_3 en 1 ml. de agua se agregaron 0.09 ml. (9×10^{-6} M) de una solución de 100 mmol/ml. de anhídrido mixto de carboximetilmorfina (ver más adelante) en dimetilformamida (DMF) y se dejó reposar la mezcla toda la noche a 4°C . Luego, la solución fue pasada a lo largo de una columna de 1 x 10 cms. empacada con Sephadex G-25 y el efluente fue usado para morfina enlazada con peroxidasa, para hacer el ensayo de la morfina.

10

15

A. (2) El anhídrido mixto de isobutilclorofornato O^3 -carboximetilmorfina fue preparado como solución en DMF de 100 mmol/ml. Cinco mg, de peroxidasa de rábano picante (HRP) (1.5×10^{-6} mol de residuos de lisina) fueron disueltos en 0.5 ml. de agua. La solución fue enfriada a 4°C ., y luego se ajustó el pH a 9.5 con solución diluida de NaOH. Noventa microlitros (9×10^{-6} mol) del anhídrido mixto fueron agregados en por-

20

25



ciones de 10 microlitros, mientras el pH era manteni-
do a 9-10 con adiciones intermitentes de NaOH. La mez-
cla fue agitada durante una hora y dializada exhausti-
vamente contra agua.

5 B. Una primera solución (solución A) fue
preparada disolviendo 100 mg. de lisozima (6.9×10^{-6} mols) en 10 ml. de agua y agregando carbonato de sodio hasta que se obtuvo un pH de 8.0.

10 Una segunda solución fue preparada suspen-
diendo 34.3 mg. (1×10^{-4} M) de carboximetilmorfina en 2 ml. de DMF anhidra. Después de enfriar a -15°C .,
fueron agregados 13.1 microlitros de isobutilcloro-
formato (1×10^{-4} M) para formar anhídrido mixto. La
solución fue agitada a -15°C ., durante alrededor de
15 30 minutos en cuyo tiempo se disolvieron los sólidos.

La Solución A fue enfriada en un baño de
hielo y se agregó el anterior anhídrido mixto de mor-
fina. Después de almacenar a 4°C ., durante 14 horas,
la solución fue dializada contra agua destilada du-
rante 4 días (2,000 ml. de agua cambiada 2 veces al
20 día).

La proteína fue liofilizada y el residuo di-
suelto en 10 ml. de fosfato de sodio 0.128M, pH 7.15.
La mezcla producto fue fraccionada sobre una columna
25 de resina permutadora de cationes débil (Biorex 70),

16 SET 1974

fue eluida a razón de 1 ml. por minuto con un gradiente lineal de 400 ml. en la gama desde 0.128 hasta 0.400M de fosfato de sodio, pH 7.15. El eluto fue recogido en fracciones de 1 ml. La cromatografía fue vigilada continuamente midiendo la absorción ultravioleta a 280 nm. Fueron obtenidas cinco fracciones. La actividad de lisozima fue medida de acuerdo con la siguiente técnica.

Se preparó una suspensión de 0.35 mg/ml de bacterias secas, *Micrococcus lysodeikticus*, en fosfato de sodio 0.05M, pH 7.0. A 2.85 ml. de la suspensión contenidos en una cubeta de 3 ml. se agregan 0.10 ml. de solución de cloruro de sodio al 8.76% peso/volumen y 0.025 ml. de solución de enzima (7.5×10^{-6} gramos de proteína). Los contenidos son mezclados y colocados en un espectrofotómetro graduado a 435 nm. Se registra la tasa de disminución de densidad óptica con el tiempo y la tasa se expresa como unidades de densidad óptica por minuto por 7.5×10^{-6} gramos de proteína. La siguiente tabla indica las fracciones, los miligramos de proteína por miligramo y la tasa de reacción.

25



Fraciones	= Mg. de proteína	Tasa D.O./min./7.5 x 10 ⁻⁶ gramos de proteína
a	0.15	0.027
b	0.18	0.033
5 c	0.26	0.040
d	0.28	0.047
e	0.31	0.043
Lisozima	0.30	0.070

EJEMPLO III-Conjugación de Meperidina con Lisozima

10 A. 2.23 gramos de hidrocloreuro de 4-ciano-4-fenilpiperidina fueron disueltos en 15 ml. de agua a la cual se habían agregado 4 ml. de hidróxido de potasio acuoso al 50%. El aceite fue extraído con 3 x 15 ml. de éter y las capas orgánicas fueron secadas sobre sulfato de magnesio anhidro. La filtración y evaporación de la solución dieron un residuo que fue colocado en una ampollita de vidrio junto con 3 ml. de metanol y 1.23 ml. de hidróxido de potasio acuoso al 50%. La ampollita sellada fue calentada a 165-170°C. durante 20 3.5 horas y diluida con 50 ml. de agua. Después de la extracción con cloroformo, la fase acuosa fue neutralizada con DOWEX 50-58. (forma de H⁺) a pH 6.0. La filtración y evaporación rindieron un residuo (0.82 gramo.) el cual se fundió a más de 300°C. La recristalización a partir de agua y el secado sobre pentóxido de fósforo 25

16 SET 1974

dieron un compuesto con punto de fusión de 285-286°.

5 B. Fueron refluidos 1.8 gramos de 4-carboxi-4-fenilpiperidina en 50 ml. de hidrocloreto etanólico al 5% durante 4 horas. El residuo, a la evaporación del solvente fue disuelto en acetona y la parte insoluble fue eliminada por filtración. A partir de la solución en acetona, permaneció un aceite viscoso en la evaporación, el cual se cristalizó al dejarlo reposar. Tuvo punto de fusión de 197-110°C. (1.068 gramos).

10 Fue utilizado sin purificación adicional

o bien,

15 B'. Una solución de hidrocloreto de 4-ciano-4-piperidina en 6 ml. de ácido sulfúrico al 66% fue calentada a 145°C. y agitada durante 45 minutos. Al enfriarla a 125°C., la solución se volvió ligeramente más viscosa. La adición de alcohol (el rabo del embudo para adición debajo de la superficie de la mezcla reactiva, reduce la temperatura a 105°C. Fue mantenida así durante 4 horas. Durante la primera hora fueron

20 agregados 20 ml. de alcohol y en la siguiente hora 6 ml. cada una. Los vapores de alcohol fueron removidos por una destilación continua. Al final de la adición, la temperatura fue elevada a 125° hasta que ya no se formó más condensado. La solución caliente fue vertida

25 sobre 6 ml. de agua/40 gramos de hielo que contenía 8



16. SEPT

gramos de hidróxido de sodio. Después de la extracción con 3 x 70 ml. de éter, secado sobre sulfato de magnesio anhidro y remoción del solvente, quedó un aceite que fue destilado a 112-115°C. con 0.2 mm. de Hg, 4.01
5 gramos (54%).

C. 4.01 gramos de 4-carbetoxi-4-fenilpiperidina fueron disueltos en 13 ml. de alcohol absoluto y refluídos junto con 2.01 gramos de cloroacetato sódico. Después de 7 horas no había presente ningún material de partida, como se puso de manifiesto con TLC. El
10 cloruro de sodio precipitado fue removido por filtración y lavado con 3 ml. de etanol. Al enfriarse el filtrado, aparecieron cristales blancos. La filtración y el secado dieron 2.9 gramos (58%) del compuesto titulado., con p.f. de 148-140°C. La evaporación del licor madre dió un cristal que no se cristalizó a partir
15 de acetona/hexano.

D. A una solución de 29.7 gramos (0.1 mmol) de 4-carbetoxi-1-carboximetil-4-fenilpiperidina en
20 1.0 ml. de dimetilformamida seca, a 0°C, se agregaron 13.1 microlitros de isobutilcloroformato (01 mmol). La mezcla fue agitada a 0°C., durante una hora.

E. La solución fría de anhídrido mixto (preparada como se dice antes) fue agregada gota a gota
25 a una solución de 100 mg. de lisozima (6.9 mmol) y 100



16 SET. 1974

mg. de bicarbonato de sodio en 10 ml. de agua a 0°.

La reacción fue agitada a 4°C., durante 24 horas y luego dializada contra agua durante 48 horas. El agua fue cambiada 3 veces al día. El conjugado de enzima
5 parcialmente purificado, luego, fue cromatografiado sobre Bio-Rex 70 usando un gradiente de amortiguador de fosfato de 0.05-0.20M, pH 7.15. La actividad de lisozima en el eluto fue seguida por el ensayo convencional de la lisozima empleando *Micrococcus leish-*
10 *dikticus* (20 mg./50 ml. de amortiguador). La adición de gamma-globulina de conejo u oveja inmunizados con el conjugado BSA del ácido meperidínico, ocasionó que el conjugado lisozima-meperidina quedase casi completamente inhibido. La adición de meperidina libre al
15 complejo de enzima inhibida-anticuerpo condujo a la restauración de la actividad de lisozina.

EJEMPLO IV-Conjugación de Anfetamina a Lisozima

A. Sulfato de amfetamina (3.68 gramos, 20 mmols de amina) fueron disueltos en hidróxido de sodio 0.5N (80 ml.). La solución alcalina fue extraída
20 con éter, el éter fue secado y evaporado. El residuo fue disuelto en 50 ml. de benceno y diisopropiletilamina (3 ml.) fue agregada, seguida por etilbromoacetato (2.2 ml., 20 mmols). La mezcla reactiva fue re-
25 fluida durante una hora, enfriada, filtrada y se eva-



16 SET 1974

poró el filtrado. El residuo fue captado en éter, lavado varias veces con agua y el éter fue secado y evaporado. El aminoéster puro fue obtenido por cromatografía de columna sobre sílice (hexano:éter 7:3). El rendimiento fue de 3:1 gramos. (70%). El NMR y el IR concuerdan con la estructura.

B. El aminoéster (2.5 gramos, 11.3 mmols) fue disuelto en una mezcla 1:1 de metanol e hidróxido de sodio 1N (50 ml.) y dejada reposar toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla fue evaporada a un volumen pequeño, lavada dos veces con éter (2 x 25 ml.) y acidificada a pH 6.0 con ácido clorhídrico concentrado. Los cristales que se separaron fueron recristalizados desde éter acetona para dar dos fracciones: 900 mg., p.f.=222-25 (p.f. en literatura 220-5°C., Tetra. Letters. 1966, 4603-7) y 450 mg. p.f. 210-218°C. Solamente la primera fracción fue utilizada para reacciones adicionales.

20 $\lambda_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{máx.}}$ 257_{nm} $\epsilon=159$

C. Ácido amfetaminocarboxílico (700 mg. 3.8 mmols) fue suspendido en dióxano seco a 40°C. (50 ml.) y fosgeno (12.5% por peso) en benceno, 20 ml. fue agregado en una sola porción. La mezcla reactiva fue agitada a 40-50°C., durante 3-1/2 horas, evaporada hasta la



16 SET 1974

sequedad y vuelta a disolver en dioxano seco (20 ml.). Esta solución fue mantenida en hielo para el siguiente paso.

5 D. N-carboximetilamfetamina (25 mg., 0.133 mmol) fue suspendida en 1.8 ml. de dioxano seco a 40°C. Se agregó fosgeno (12.5% por volumen en benceno) en una sola porción. (0.715 ml.). La mezcla reactiva fue agitada a 40°C., durante 3-1/2 horas antes de que fueran agregados 0.2 ml. de fosgeno (12.5% por volumen en benceno). Después de agitar 30 minutos adicionales, la solución se volvió homogénea. El solvente fue eliminado bajo vacío a 25°C en la capucha. Se agregó 0.70 ml. adicional de dioxano seco para usarse en el siguiente paso.

10

15 E. La solución fría de dioxano del producto anterior fue agregada gota a gota en un lapso de 5 minutos a una solución agitada, fría (0°C.) de 200 mg. de bicarbonato de sodio y 100 mg. de lisozima en 10 ml. de agua. La mezcla reactiva lechosa fue agitada a 4° durante 48 horas y, luego, dializada contra agua (1 litro cambiada 3 veces al día) durante 48 horas. El residuo fue liofilizado y el residuo utilizado para estudios de actividad e inhibición.

20

EJEMPLO V-Conjugación de Ecgonina con Lisozima

25 A. 5 gramos de cocaína fueron refluidos en



25 ml. de agua durante 6.5 horas. El aceite restante
después de la evaporación de la solución fue disuelto
en 5 ml. de agua caliente. Al enfriarse, se separaron
cristales blancos, largos (2.87 gramos). Se obtuvie-
5 ron otros 543 mg. del licor madre.

B. Un gramo de benzoilecgonina fue refluído
en 25 ml. de ácido clorhídrico 2N durante 1 hora. Des-
pués de enfriar, la solución fue filtrada y extraída
con éter. La fase acuosa fue neutralizada con bicarbo-
nato de sodio a pH 5.8. Al ocurrir la evap_poración, que-
10 dó un residuo blanco que fue refluído con 40 ml. de
etanol al 95%, filtrado y el solvente fue evaporado.
El residuo aceitoso (580 mg.) se cristalizó al hacer
la adición de 0.5 ml. (130 mg.) de etanol, con p.f. de
15 135-197°C., con descomposición.

C. A una suspensión de 22.7 mg. (0,1 mmol)
de hidrocloreuro de ecgonina en 1.0 ml. de metilforma-
mida seca a 0° se agregaron 13.7 microlitros de iso-
butilcloroformato (0.1 mmol). La mezcla fue agitada
20 a 0° durante 2 horas y luego usada para la conjuga-
ción.

D. A una solución fría, a 4° de 100 mg. de
lisozima (6.9 mmol) y 100 mg. de bicarbonato de sodio
en 10 ml. de agua se agregó la suspensión en dimetil-
25 formamida del anhídrido mixto. La solución homogénea

10
16 SET. 1974

fue agitada a 4^º durante 40 horas y luego dializada
contra agua (1 litro cambiado 3 veces al día), duran-
te 4 días. El material dializado, después, fue liofi-
lizado hasta la sequedad. Con este material se efec-
5 tuaron estudios de actividad e inhibición.

EJEMPLO VI-Conjugación de Fenobarbital con Lisozima

A. Fenobarbital sódico (5.08 gramos, 0.02
mols), cloroacetato metílico (2.16 gramos, 0.02 mols),
metanol (14 ml.) y una cantidad catalítica de dimetil-
10 formamida (1 ml.) fueron refluídos durante 2 horas.
Durante este periodo, se separó un precipitado blan-
co. La mezcla reactiva fue enfriada a la temperatura
ambiente y filtrada. El filtrado metanólico fue evapo-
rado hasta la sequedad para rendir alrededor de 5
15 gramos de un material gomoso, que se solidificó al
dejarlo reposar. (El precipitado de la filtración an-
terior se disolvió parcialmente cuando fue vuelto a
lavar con agua destilada. El material insoluble en
agua, alrededor de 50 mg., demostró ser el producto
20 dialquilado).

El material solidificado fue agitado con
20 ml. de solución 1N de NaOH durante 15 minutos y
luego filtrado. Esto, separó los derivados insolubles
en álcali, el producto monoalquilado y el fenobarbital
25 sin reaccionar. El filtrado alcalino fue acidificado



con ácido clorhídrico concentrado a pH 2 y el precipitado gomoso blanco que se formó, fue captado en cloruro de metileno.

5 El secado sobre $MgSO_4$ y la evaporación del solvente orgánico rindieron 4 gramos de material gomoso. Este fue disuelto en benceno y cromatografiado sobre una columna de gel de sílice (40 gramos). La elución fue con cloroformo y se recogieron fracciones de 100 ml. (El adelanto de la cromatografía fue seguido por TLC, dado que el producto dialquilado tiene un R_f 0.9, el material monoalquilado R_f 0.6 y el fenobarbital R_f 0.1, con cloroformo/metanol 95:5).

10 Las fracciones 2 a 5 combinadas rindieron, a la evaporación 1.6 gramos de una goma que se solidificó al dejarla reposar. La trituration con éter de petróleo y la filtración rindieron 1.5 gramos de un polvo blanco que, con NMR se mostró que era el derivado monoalquilado requerido: N-metoxycarbonilmetilfenobarbital.

15 20 La elución adicional con cloroformo (500 ml.) rindió 1.5 gramos de un sólido blanco que se mostró ser fenobarbital sin reaccionar.

25 B. El monoéster preparado antes (1 gramo) fue refluído con 10 ml. de solución al 20% de ácido clorhídrico durante 3.5 horas. La mezcla reactiva en-



16 SET. 1974

friada fue diluida con agua (20 ml.) y extraída con éter. La evaporación del extracto en éter rindió 0.98 gramo de una goma incolora que se solidificó muy lentamente al dejarla reposar. La NMR y TLC mostraron que al ácido le había ocurrido una hidrólisis completa.

Se preparó una muestra pura de ácido mediante TLC preparatoria para el análisis UV, con cloroformo/metanol (5:1) como eluente.

C. A una solución fría, 0°C., de 29.6 mg. de N-carboximetilfenobarbital (0.1 mmol) en 14.3 microlitros de trietilamina (0.1 mmol) en 1.0 ml. de dimetilformamida seca, se agregaron 13.1 microlitros de isobutilcloroformato (0.1 mmol). La solución fue agitada a 4° durante 1 hora antes de usarla.

D. La solución fría de anhídrido mixto fue agregada gota a gota, con agitación, a una solución fría (4°C) de 0.100 gramo de lisozima (6.0 mmols) y 0.100 gramo de bicarbonato de sodio en 10 ml. de agua. La solución heterogénea resultante fue almacenada a 4° durante 48 horas antes de ser dializada contra agua durante 48 horas. (El dializado, luego, fue cromatografiado sobre Bio-Rex 70, empleando para la elución un gradiente de amortiguador de fosfato de 0.05-0.20M, pH 7.15. La actividad de lisozima en el eluen-



te fue seguida del ensayo convencional de lisozima empleando micrococcus lysodeikticus (20 mg/50 ml. de amortiguador). La adición de gammaglobulina de ovejas inmunizadas con el conjugado BSA de N-carboximetilfenobarbital ocasionó que el conjugado lisozima-fenobarbital quedase casi completamente inhibido. La adición de fenobarbital libre al anticuerpo de enzima inhibida condujo a la restauración de la actividad de la lisozima.

10 EJEMPLO VII-Conjugado de Secobarbital, BSA y Lisozima

A. Se pasó ozono a través de una solución enfriada (hielo seco/acetona) de secobarbital sódico (2.6 gramos, 0.01 mol) en metanol (250 ml). Después de concluida la ozonólisis (prueba KI positiva), se pasó nitrógeno a través de la mezcla reactiva para remover todas las huellas de ozono y, luego, se agregó dimetilsulfuro (y ml.) a la solución fría con una jeringa y se dejó reposar toda la noche a la temperatura ambiente. Después de la evaporación del solvente, el residuo fue diluido con agua (20 ml.) acidificada con ácido clorhídrico concentrado y extraído con cloroformo (3 x 20 ml.). El extracto de cloroformo fue secado sobre $MgSO_4$ y evaporado para rendir 2.4 gramos de un material gomoso incoloro. La NMR mostró la presencia de un grupo aldehído a 89.7 ppm. Este fue usado

10
16 SET. 1974

sin purificación adicional en la reacción con ácido malónico.

5 B. Una muestra de aldehído puro (0.24 gramo, 1 mmol), ácido malónico (0.21 gramo, 2 mmols), 20 ml. de piridina y 1 ml. de piperidina fueron refluídos juntos durante 6 horas. El solvente fue eliminado en el evaporador instantáneo al vacío y el residuo disuelto en una solución al 10% de bicarbonato de sodio. La solución de bicarbonato fue lavada con éter (3 x 20 ml.) y luego acidificada con ácido clorhídrico concentrado. 10 La extracción con éter (3 x 20 ml.) y, luego, con cloroformo (2 x 25 ml) seguida por secado sobre $MgSO_4$ y la evaporación de las capas orgánicas combinadas rindió 0.23 gramo (rendimiento 80%) de un sólido blanco, del cual NMR mostró que era el ácido deseado: ácido-(ácido α -crotónico)-5-(1'-metilbutil)barbitúrico. La recristalización a partir de $CHCl_3/CCl_4$ rindió 0.16 gramo de material puro. 15

20 C. A una solución de ácido 5-(ácido α -crotónico)-5-(1'-metilbutil)barbitúrico (0.282 gramo, 1 mmol) en dimetilformamida (3 ml.), enfriada a $-15^\circ C$. (baño de hielo-sal), se agregaron trietilamina (0.28 ml., 2 mmols) e isobutilcloroformato (0.13 ml., 1 mmol). Se continuó la agitación a -15° durante 15 minutos y, luego, 25 a 0° durante 30 minutos. La mezcla reactiva fue agregada,



gota a gota, con una jeringa a una solución enfriada de BSA (400 mg.) en agua (56 ml.) que contenía NaHCO_3 (2.6 gramos). La mezcla reactiva fue agitada a 0° (cuarto frío) durante 5 días cuando la turbidez inicial había desaparecido casi toda. Luego, la solución fue dializada contra 4 litros de amortiguador de fosfato (pH 8) seguido por agua destilada, para rendir el conjugado deseado.

D. Fueron disueltos 240 mg. de lisozima (100 mmols) de lisina) en 20 ml. de agua y la solución fue enfriada a 0°C . La solución fue ajustada a pH 10.2 con hidróxido de sodio al 0.05N y el anhídrido mixto (100 mmols) en 1.5 ml. de dimetilformamida seca fue agregado gota a gota, mientras la solución era mantenida entre pH 9.6 y 9.9 mediante la adición de base según se requirió. El pH fue mantenido a 9.6 durante otros 30 minutos, después de los cuales fue centrifugada la mezcla.

El sobrenadante fue dializado contra 0.5 mol de tris-maleato, pH 8.0. El nódulo formado por la centrifugación se disolvió en 20 ml. de urea 8M y fue dializado como se describe antes y rindió cantidades adicionales de enzima. El tratamiento de diálisis de urea se repitió hasta que sólo quedaron 10 mg. de material insoluble.

16 SET 1974

EJEMPLO IX-Conjugado de Análogo de Metadona con Lisozima

(A) Una solución de dibromuro de tetrametileno (32.4 gramos, 150 mmols) en éter seco (150 ml.) fue agregada a magnesio (10.9 gramos, 450 mmols) en éter (80 ml.) a un régimen tal que el éter refluía. La reacción fue llevada a acabo en atmósfera de argon. Después de terminar la adición, la mezcla reactiva fue hervida durante una hora. Se agregó una solución de 2,2-difenil-4-dimetilaminovaleronitrilo (I), (preparada de acuerdo con J. W. Cusic, J. Am. Chem. Soc., 71, 3546, 1949), (8.4 gramos, 30 mmols) en 100 ml. de xileno seco, en el curso de 30 minutos a la temperatura ambiente y la mezcla fue agitada a 55°C. durante una hora. La mezcla reactiva fue enfriada en un baño de agua helada y se pasó CO₂ a través de ella con agitación rápida durante 4 horas. Se agregaron 200 ml. de agua y ácido clorhídrico concentrado (100 ml.), el magnesio fue retirado por filtración y el filtrado fue refluído durante 2 horas. La solución transparente, enfriada, fue lavada con éter (3 x 150 ml.) y extraída con diclorometano (3 x 150 ml.). Este extracto fue evaporado hasta la sequedad y el residuo fue disuelto en 0.5 litro de hidróxido de sodio 0.5N.

Esta solución fue lavada con éter (3 x 100 ml.), hecha acídica con 150 ml. de ácido clorhídrico



concentrado, saturada con cloruro de sodio y extraída con diclorometano (3 x 200 ml.). La evaporación del solvente dejó un aceite: hidrocioruro 6-ceto-7,7-difenil-9-(dimetilamino) de ácido decanoico (7.55 gramos. 5 60%), el cual se mueve como un solo punto en TLC (HCCl₃:MeOH 8:2 y 7:3)

Espectro U.V.

0.02% de CF₃COOH

λ Máx.	293 (ε=540);
10	264 (ε=500);
	259 (ε=535).

(B) El ácido (21.0 mg., 50 mmols) fue disuelto en 1 ml. de dimetilformamida seca, se agregaron 2 gotas de trietilamina y la solución enfriada fue tratada con 6.5 microlitros de isobutilclorofor- 15 mato como se describió antes en otras preparaciones.

(C) Fueron disueltos 120 mg. de lisozima (50 mmols de lisina) en 12 ml. de agua. El pH fue ajustado a 10 con hidróxido de sodio 0.05N y manteni- 20 do allí durante la adición, gota a gota, de la solución de anhídrido mixto. Después de 30 minutos de agitación adicional, la mezcla fue centrifugada. La fracción sobrenadante permaneció homogénea durante la diálisis contra agua y contuvo el conjugado de 25 lisozima con el análogo de metadona.



EJEMPLO X-Conjugación de Carboximetilmorfina (CMM)
con Dehidrogenasa de Malato (MDH)

Se obtuvo MDH de corazón porcino como sus-
pensión de 8 mg/ml. en sulfato de amonio 2.8M. Un
5 cc. de esta solución (2×10^{-7} mols de MDH) fue cen-
trifugada y el nódulo fue disuelto en 1 cc. de agua
a 4°C. El pH fue ajustado a 9.0 con NaOH diluido y
se agregaron 0.30 ml. de la solución de anhídrido
10 mixto en porciones de 10 microlitros. Durante la adi-
ción, el pH fue mantenido entre 8 y 9. Después de
terminada la adición, la mezcla fue agitada durante
1 hora, a 4°C. Se agregó suficiente amortiguador de
fosfato 0.05M, pH 7.5 para dar un volumen total de 5
15 cc., y la solución fue dializada contra ese amortigua-
dor.

EJEMPLO XI-Conjugación de Testosteron-3-carboximetiloxi-
ma con Dehidrogenasa de Malato (MDH)

La testosteron-3-carboximetiloxima (36.1
mg., 100 mmols) fue disuelta en 1 ml. de dimetilfor-
20 mamida que contenía 3 gotas de trietilamina. La solu-
ción fue enfriada a -15°C., y se agregaron 13.1 mi-
crolitros (100 mmols) de isobutilcloroformato, se agi-
tó durante una hora a -15°C. a -5°C., durante cuyo
tiempo la solución tomó un color naranja claro.

25 La dehidrogenasa de malato, a razón de 0.5



cc. de suspensión de 10 mg/ml. en sulfato de amonio
2.8M (5 mg. de MDH, 6.8×10^{-8} mols de MDH, $4.4 \times$
 10^{-6} mols de residuos de lisina) fue centrifugada a
15,000 rpm durante 20 minutos. El nódulo fue disuel-
5 to en 1 ml. de agua y la solución fue dializada con-
tra agua a 4°C. durante 5 horas (3 cambios). La solu-
ción fue llevada a pH 8.5 con NaOH diluido a 4°C. y
44 microlitros de la solución de anhídrido mixto (4.4
mmols de anhídrido mixto corresponden a 1 hapteno
10 por lisina), fue agregada a la solución agitada de
enzimas, en tres porciones en el curso de 5 minutos.
Se agregó la cantidad necesaria de solución de hidró-
xido de sodio para mantener el pH a 8.5. Inicialmente,
la solución estaba turbia, pero se aclaró durante 1
15 hora de agitación a 4°C.

La solución fue dializada exhaustivamente
contra amortiguador de fosfato 0.05M, pH 7.5. Se eli-
minó por centrifugación una pequeña cantidad de sedi-
mento. Hubo alrededor de 17 grupos por MDH.

20 Ensayo: Debido a la inestabilidad de solu-
ciones de enzimas altamente diluidas, la solución
base (5 mg/ml; 3.4×10^{-5} M) fue diluida 1 a 500 justa-
mente antes de cada ensayo. El orden de adición de
reactivos a la mezcla para ensayo fue como sigue: 1)
25 anticuerpo (cuando se usó); 2) enzima diluida; 3)



ácido oxalacético; 4) NADH. La concentración final
de enzima fue de 2.7×10^{-9} M. La concentración de
anticuerpo no se conoció. Se usó suficiente anticuerpo
para lograr una inhibición mayor del 40% de la
5 actividad enzimática. Esto correspondió a un equiva-
lente de 10 microlitros de un suero que contenía an-
ticuerpos.

(1) Enzima sola: 0.073 D.O./min. (2) Enzima
+ anticuerpo: 0.042 D.O./min. (3) Enzima +anticuerpo
10 +50 microlitros de testosterona 10^{-5} M (agregada pri-
meramente): 0.073 D.O./min.

Ensayo de la Codeína

A fin de demostrar la inhibición de la ac-
tividad de la lisozima modificada por morfina por
15 los anticuerpos y el retorno de la actividad mediante
la adición de codeína, se llevaron a cabo los siguien-
tes experimentos. A alícuotas de las diversas frac-
ciones de la lisozima modificada por morfina, se agre-
gó anticuerpo y se determinó el régimen. En esta for-
20 ma, se pudo determinar el efecto del anticuerpo so-
bre la actividad enzimática y la codeína para regene-
rar la actividad enzimática. La siguiente Tabla indi-
ca los resultados obtenidos.

25



16

Fracción	Enzima Modificada por Morfina, M	Anticuerpo M ² x 10 ⁻⁷	Codeína M x 10 ⁻⁷	D.O./min. x 10 ³
a	3.3 x 10 ⁻⁷	---	---	33
"	"	4.2	---	17
"	"	"	6.7	27
"	"	13	---	8
"	"	"	30	15
"	"	"	67	25
b	"	---	---	65
"	"	13	---	10
"	"	"	30	20
"	"	"	67	37
c	1.2 x 10 ⁻⁷	---	---	43
"	"	6.7	---	7
"	"	"	33	13
"	"	"	67	23
d	"	---	---	47
"	"	6.7	---	10
"	"	"	33	20
"	"	"	67	25
e	"	---	---	43
"	"	6.7	---	8
"	"	"	33	12
"	"	"	67	20
"	"	3.3	---	17
"	"	3.3	33	25

16 SET 1974

* Moles basados en sitios de enlace.

Los resultados anteriores demuestran claramente la extrema sensibilidad del sistema. Utilizando el anticuerpo en cantidades equimolares (con base en los sitios de enlace) o en algún exceso con enzima, se puede lograr una reducción hasta de 85% en la actividad. Una parte substancial de la actividad puede ser regenerada por una cantidad tan pequeña como 10^{-6} mols de codeína. Dicho sea entre paréntesis, la lisozima no se afecta en lo absoluto con la presencia de anticuerpo o de codeína.

Se llevó a cabo como sigue una evaluación detallada adicional: La concentración de enzima fue mantenida constante a 1.7×10^{-7} M, mientras que se agregaban cantidades variables de anticuerpo de morfina. El régimen fue determinado con diversas concentraciones del anticuerpo de morfina. La fracción "c" fue utilizada como fuente de la enzima. La siguiente Tabla indica los resultados obtenidos:

<u>Anticuerpo, M[*] x 10⁸</u>	<u>Régimen (D.O./min.) x 10³</u>
0	45.7
1.7	45.7
3.3	46.0
6.7	38.6
12	33.6



16 SET. 1974

	<u>Anticuerpo, M[*] x 10⁸</u>	<u>Régimen (D.O./min.) x 10³</u>
	17	28.3
	25	21.4
	33	16.1
5	50	8.3
	67	7.1
	130	7.2

* Concentración en sitio de enlace.

En el siguiente experimento, la concentración de enzima fue mantenida constante a 1.7×10^{-7} M y la concentración en el sitio de enlace del anticuerpo fue mantenida constante a 5.0×10^{-7} M. Se agregaron cantidades variables de codeína y se determinó el régimen.

La siguiente tabla indica los resultados.

	<u>Codeína, M x 10⁸</u>	<u>Régimen (D.O./min.) x 10³</u>
15	530	45.0
	270	31.3
	130	28.0
	67	26.0
20	33	22.1
	17	16.7
	6.7	12.9
	1.3	10.0
	---	8.3

Las tablas anteriores demuestran convincente-

16 SET 1974

mente la extrema sensibilidad del sistema. Con una cantidad de codeína tan pequeña como 1.3×10^{-8} M., se obtiene una diferencia detectable en el régimen.

5 También se efectuaron ensayos empleando el fenobarbital conjugado con lisozima del Ejemplo VI y el secobarbital conjugado con lisozima del Ejemplo VII. Tanto el análogo de fenobarbital como el análogo de secobarbital habían sido conjugados con albúmina de suero de bovino (BSA) y con anticuerpos obtenidos por procedimientos conocidos, inyectando los conjugados con albúmina de suero de bovino en animales y, luego, recogiendo los anticuerpos.

10 El procedimiento empleado fue, primero, preparar cierto número de soluciones reactivas. La solución amortiguadora fue 0.05 tris-maleato a pH 6; la solución de albúmina de suero de bovino fue 0.1% por peso de BSA en amortiguador de tris-maleato; la solución bacteriana fueron *Micrococcus lysodeikticus* (30 mg.) en 50 ml. del amortiguador. La suspensión fue preparada apenas 12 horas antes de usarla y almacenada a 4°C; la solución de barbiturato conjugado con lisozima es diluida con la solución de albúmina de suero bovino. El grado de dilución es tal como para proveer un régimen de aproximadamente 0.21 D.O./min. con una solución que contenga 0.2 ml. de solución bacteriana, 0.02 ml. de albú-

16 SEP 1964



mina de suero de bovino, 0.08 ml. de orina sintética
y 0.5 ml. de la solución de lisozima. Las soluciones
de gammaglobulina (en 0.025 de tris maleato, pH 7.4),
anti-secobarbital y anti-fenobarbital, están a una
5 concentración adecuada para que 20 inhiba 92-96%
de la actividad específica de la lisozima. La orina
sintética se obtiene disolviendo en 1 litro de agua
destilada, 5.2 gramos de cloruro de potasio, 8.2 gra-
mes de cloruro de sodio, 1.4 gramos de fosfato sódico
10 co dihidrogenado, 1.4 gramos de fosfato disódico mo-
nohidrogenado y 11 gramos de urea. Las soluciones nor-
males de barbiturado (fenobarbital o secobarbital) se
preparan disolviendo la cantidad deseada del barbi-
turato específico en orina sintética.

15 El ensayo se lleva a cabo introduciendo
0.2 ml. de la solución bacteriana en un matraz para
muestra, agregando 20 λ de la γ -globulina anti-bar-
biturato en particular, agregando 80 λ de la muestra
de orina y diluyendo la mezcla con 0.5 ml. de la so-
20 lución de enzima. Luego, la mezcla reactiva es aspi-
rada hacia dentro del espectrómetro y la disminución
en la densidad óptica es medida a 436 nm durante 40
segundos a 30°. Se puede usar cualquier intervalo de
tiempo de 10 a 60 segundos. La concentración del bar-
25 biturato específico en la muestra de orina se deter-

16 SEP 1972

mina con una curva preparada utilizando soluciones normalizadas. Se ha provisto una corrección en blanco empleando una solución de 0.52 ml. de albúmina de suero bovino al 0.1% en una solución de 0.025 tris-maleato, pH 6, en lugar de las soluciones de γ -globulina anti-barbiturato y de lisozima conjugada con barbiturato. Este blanco se subtrae del resultado obtenido con las muestras de orina.

10 Siguiendo los procedimientos anteriores, fue probado un buen número de muestras de orina, conocidas y desconocidas para hallar la presencia de secobarbital y fenobarbital. Se encontró que los resultados eran casi idénticos con los de la cromatografía de capas delgadas (TLC) y otro método de inmunoensayo
15 dependiente de un detector estable de radicales libres.

En adición, se encontró una reactividad cruzada con otros barbituratos, que estuvo substancialmente ausente con los que no eran barbituratos, incluyendo compuestos con estructuras similares, tales como la glutetimida.

20 Siguiendo el procedimiento anterior, se efectuaron un buen número de ensayos en busca de metadona. Fueron tomadas muestras de orina de un caso clínico de metadona y analizadas en busca de metadona. De 65
25 muestras,



muestras, la cromatografía en capas delgadas mostró que 62 de las muestras eran positivas, mientras que el ensayo de referencia mostró que 63 de las muestras eran positivas.

5 Se llevaron a cabo ensayos adicionales variando la enzima. Se emplearon en los ensayos un buen número de otras enzimas que estaban conjugadas con O^3 -carboximetilmorfina. A continuación aparecen descripciones de los diversos ensayos.

10 (1) Para el ensayo del rábano picante, se preparó un substrato especial. El donante monómero, un análogo del verde de malaquita, fue preparado haciendo reaccionar ácido toluico y p,p'dimetilaminobenzofenona en presencia del ácido sulfúrico para formar el tinte
15 leuco. El tinte leuco fue convertido en el anhídrido mixto con la misma técnica utilizada para la carboximetilmorfina; la concentración fue de 0.15 mmol/ml. de DMF. Alcohol polivinílico (la viscosidad de una solución acuosa al 4% a 20° es de 4 a 6 centipoises), en
20 cantidad de 44 mg. (equivalente a 1 mmol de monómero de alcohol vinílico) fue hecho pasta aguada en 5 ml. de dimetilformamida. Al ser calentado a 100°C., el alcohol polivinílico se disolvió. A la solución se agregaron
25 2.5 ml. del anhídrido mixto y 0.5 ml. de piridina y fueron dejados bajo N_2 a 100°C., durante 14 horas. Durante



16 SET. 1974

la reacción, ocurrió una considerable oxidación del tinte.

La mezcla fue concentrada hasta la sequedad y el residuo fue lavado detenidamente con acetona para eliminar el anhídrido mixto sin reaccionar. La mezcla fue disuelta en 20 ml. de agua y dializada contra agua. El polímero resultante fue activo como substrato para HRP y dió un color azul. Para el ensayo, la solución anterior fue diluida 3 a 10 con amortiguador de tris-maleato 0.05M, pH 6.0. A 10 ml. de la solución se agregaron 0.100 ml. de peróxido de hidrógeno 0.39M. A 1 ml. de esta mezcla se agregaron enzima, anticuerpo y hapteno y se midió el régimen de desarrollo de D.O. a 620 nm.

Enzima, M	(AB), M	Codeína, M	Régimen, D.O./min
1.25×10^{-9}	-	-	0.070
1.25×10^{-9}	1×10^{-8}	-	0.050
1.25×10^{-9}	1×10^{-8}	5×10^{-6}	0.068

El siguiente ensayo fue con α -amilasa.

(2) La α -amilasa de *Bacillus subtilis*, 0.100 gramo (2.0×10^{-6} mol) y 0.600 gramo de bicarbonato de sodio fueron disueltos en 15 ml. de agua fría. A esta solución agitada, fría, se agregó gota a gota 1 ml. de la anterior solución de anhídrido mixto. Se con-



197.

tinuó la agitación durante 18 horas, seguida por una diálisis exhaustiva contra agua. La solución fue finalmente liofilizada.

5 Se efectuaron ensayos con el Sistema Amylochrome Roche. La amilasa marcada fue disuelta en agua a razón de 3.2 mg/litro y diluida 1 a 10 para el ensayo.

Exp.	(Sitio de enlace de anticuerpo) M.	Enzima, M	(Codeína)M	Régimen D.O./10 min.
10 1	--	6.4×10^{-9}	--	0.490
2	4.18×10^{-8}	6.4×10^{-9}	--	0.210
3	4.18×10^{-8}	6.4×10^{-9}	4×10^{-6}	0.410

El último ensayo se hizo con dehidrogenasa de malato.

15 (3) Para el ensayo, se utilizó amortiguador de fosfato 0.05M, pH 7.5. A 0.900 cc. del amortiguador se agregaron en el orden indicado:

0.50 cc. de ácido oxalacético 7×10^{-3} M., en amortiguador de pH 7.5;

20 0.05 cc. de γ -globulina antiopiateo, 3.67×10^{-7} M (concentración en sitio de enlace);

0.020 cc. de enzima 8.03×10^{-9} M en amortiguador de pH 7.5;

0.020 cc. NADG 1.4×10^{-2} M en agua.

25 La disminución en la densidad óptica a 340

16 SET 1974

nm es leída como función del tiempo a 30°C. Cuando se empleó el hapteno codeína, fue agregado al amortiguador antes que ninguno de los otros reactivos.

Ensayos:

- 5 (1) Anticuerpo omitido. Régimen es 0.0136 D.I./min.
- (2) Anticuerpo incluido. Régimen es 0.0073 D.O./min.
- 10 (3) Anticuerpo y 5 µl de codeína $1 \times 10^{-6} M$ incluidos. Régimen es 0.0107 D.O./min.
- (4) Anticuerpo y 2 µl de codeína $1 \times 10^{-6} M$ incluidos. Régimen es 0.0099 D.O./min.
- (5) Anticuerpo y 2 µl de codeína $1 \times 10^{-7} M$ incluidos. Régimen es 0.0079 D.O./min.

15 De acuerdo con la invención, las concentraciones requeridas para ensayar una amplia variedad de ligandos son del orden de $10^{-7} M$ o menos, con menos de 5 µl de solución. Por lo tanto, con cantidades extremadamente pequeñas de reactivos, se obtiene un alto

20 grado de sensibilidad. Además, la extrema especificidad de los sitios receptores hacia un compuesto particular o su análogo muy próximo, permite una amplia gama de posibilidad de ensayo con un alto grado de sensibilidad y especificidad hacia compuestos particulares. Por lo

25 tanto, pueden ser ensayadas cantidades sumamente dimi-



16 SEP 1976

nutas de materiales biológicamente activas en los diversos fluidos del cuerpo tales como sangre, saliva u orina.

5 La presente invención provee una sonda de
extraordinaria sensibilidad para el ensayo de canti-
dades en extremo diminutas de materiales específicos,
con un alto grado de especificidad y exactitud. Alter-
nativamente, el método se puede usar en forma cuali-
tativa para determinar la presencia o ausencia de ma-
10 teriales en particular, con un alto grado de especi-
ficidad. Ya ha sido desarrollada mucha tecnología pa-
ra los ensayos de enzimas. Los ensayos de enzimas son
bien conocidos, las condiciones óptimas para el ensa-
yo, los substratos y los métodos para detectar la ac-
15 tividad enzimática están ampliamente desarrollados en
la literatura. Además, gran parte del trabajo involu-
crado en el radioinmunoensayo es aplicable directamen-
te a la presente invención. Los antisueros disponi-
bles para el radioinmunoensayo son aplicables, en
20 esencia, a los ligandos empleados en la presente in-
vención.

Los métodos para enlazar compuestos con en-
zimas en sitios que no sean los sitios activos, tam-
bién están bien desarrollados. Existe amplia literatu-
25 ra sobre las funcionalidades que se pueden emplear

10 SEP 1974

para enlazar un compuesto particular a un sitio en particular o aminoácido en una enzima, sin afectar substancialmente la actividad de la enzima. Los ejemplos anteriores demuestran que la presencia de un anticuerpo cuando está enlazado a un ligando que está enlazado a una enzima, puede reducir significativamente la actividad de la enzima. Esto lo hace ya sea como barrera física o en forma alostérica. Además, la actividad enzimática es regenerada substancialmente introduciendo un ligando en el medio que pueda desplazar efectivamente al ligando enlazado con la enzima, liberando con ello a la enzima, del anticuerpo.

Al tener una enzima enlazada con un ligando, por cada ligando que desplaza a un ligando enlazado por enzima, reaccionará un gran número de moléculas del substrato y se puede medir la concentración del substrato restante del producto. Por lo tanto, se tiene una considerable amplificación (acoplando la enzima a un ligando) porque muchas moléculas son modificadas por virtud de la presencia de una sola molécula.

La presente invención permite ensayos de compuestos que están presentes en concentraciones extremadamente bajas o en cantidades absolutas. Primero, debido a que están disponibles receptores que tie-

15 SEP 1974

5 nen alta especificidad, un compuesto o un grupo de
ellos puede ser determinado sin interferencia signi-
ficativa de los otros compuestos. Por virtud de te-
ner una o más enzimas presentes en relación con un
ligando específico, se puede obtener un gran cambio
en la concentración del substrato de enzima basado
en un solo ligando. Además, el uso de enzimas provee
mayor adaptabilidad en el sistema de detección que
sea empleado.

10 La presente solicitud que corresponde a la
presentada en Estados Unidos de América, con fecha
14 de Mayo de 1.971, bajo el Número 143.609, se aco-
ge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Es-
tatuto sobre Propiedad Industrial.

15

20

- REIVINDICACIONES -

25

Los puntos de invención propia y nueva, que

16 MAY 1975

se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5 1ª.- Método mejorado para determinar la presencia de compuestos biológicamente activos empleando una enzima modificada, caracterizado porque comprende: poner en contacto en una zona líquida el medio con un ligando enlazado con enzimas, y un receptor que
10 sea común al ligando y al ligando enlazado con enzimas, y analizar para la actividad del ligando enlazado con enzimas ya sea en la presencia o ausencia del ligando enlazado con enzimas y enlazado al receptor, y comparar los resultados obtenidos con el medio presente en comparación a los resultados obtenidos en la
15 presencia de una cantidad actual de ligando.

20 2ª.- Método según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la zona líquida es substancialmente homogénea en el medio, en el ligando enlazado con enzimas, y en el receptor, el ligando es un compuesto biológicamente activo, y la actividad enzimática del ligando enlazado con enzimas es inhibida en forma substancial cuando el ligando enlazado por enzimas está enlazado al receptor.

25 3ª.- Método según la reivindicación 2ª, ca-

mfe

13-5-75

- 148 -



racterizado porque el pH de la zona líquida está en la gama de 5 a 10 y la concentración del receptor está en la gama de 10^{-4} a 10^{-14} basada en los sitios de enlace, la proporción de sitios disponibles de enlace en el receptor a las moléculas del ligando enlazado con enzimas es mayor de alrededor de 1, y la proporción entre sitios disponibles para enlace en el receptor y las moléculas del ligando, como ligando enlazado con enzimas, es menor de alrededor de 20.

4ª.- Método según la reivindicación 3ª, caracterizado porque el pH está en la gama de 6 a 9 y la proporción de sitios disponibles para enlace en el receptor y las moléculas de ligando enlazado por enzimas es mayor de alrededor de 2, y la proporción de sitios disponibles para enlace en el receptor y las moléculas del ligando, como ligando enlazado por enzimas, es menor de alrededor de 5.

5ª.- Método según la reivindicación 2ª, caracterizado porque el substrato soluble o insoluble para la enzima del ligando enlazado por enzima está presente en la zona de líquido, y la presencia del ligando es detectada midiendo el cambio en la cantidad del substrato o el producto del substrato.

6ª.- Método según la reivindicación 5ª, caracterizado porque la zona líquida es regulada en una

mGe

16 MAY 1975

gama de pH de 7,2 a 8,5 con tris-(hidroximetil)metilamina, carbonato, borato o fosfato.

5 7ª.- Método según la reivindicación 2ª, caracterizado porque el ligando es un alcaloide, esteroide, amfetamina, prostaglandina, tranquilizador, alucinógeno, vitamina, barbiturato, glutetimida, serotonina, metadona, meperidina, catecolamina, derivado de cannabinol, polipéptido, proteína, difenilhidantoína, análogo fisiomimético o metabolito del mismo.

10 8ª.- Método según la reivindicación 2ª, caracterizado porque el compuesto biológicamente activo es un compuesto orgánico biológicamente activo, con peso molecular desde 100 hasta 2000, que tiene por lo menos una funcionalidad polar.

15 9ª.- Método según la reivindicación 8ª, caracterizado porque la zona líquida es substancialmente homogénea en el medio, en el ligando enlazado con enzima, y en el receptor, el ligando es un compuesto biológicamente activo y la actividad enzimática del
20 ligando enlazado con enzima es substancialmente inhibida cuando el ligando enlazado con enzima es enlazado al receptor.

25 10ª.- Método según la reivindicación 5ª u 8ª, caracterizado porque la enzima es lisozima, y el substrato para la enzima es *Micrococcus lysodeikticus*.

am Ce 13-5-75

16 MAYO 1975



11ª.- Método según la reivindicación 5ª u
8ª, caracterizado porque la enzima es dehidrogenasa
del malato.

5 12ª.- Método según la reivindicación 8ª, ca-
racterizado porque la enzima es peroxidasa del rábano
picante, o amilasa.

13ª.- Método según la reivindicación 8ª, ca-
racterizado porque el ligando es un alcaloide o análo-
go fisiomimético de un alcaloide.

10 14ª.- Método según la reivindicación 13ª,
caracterizado porque el alcaloide es morfina.

15 15ª.- Método según la reivindicación 13ª,
caracterizado porque el ligando es un esteroide,
amfetamina, análogo fisiomimético, barbiturato o deri-
vado del cannabinol.

20 16ª.- Método según la reivindicación 13ª,
caracterizado porque el ligando es un polipéptido y
el ligando enlazado por enzima tiene, cuando menos,
una molécula de enzima por cada molécula de ligando
enlazado con enzima.

25 17ª.- Método según la reivindicación 1ª, ca-
racterizado porque la zona líquida es heterogénea,
el ligando es un compuesto biológicamente activo y
el receptor está enlazado a un soporte insoluble.

18ª.- Método según la reivindicación 17ª,

ME



caracterizado porque antes del análisis pero subse-
cuente a ponerlos en contacto, el receptor enla-
zado a un soporte y la zona líquida, son separados.

5 19ª.- Método según la reivindicación 18ª,
caracterizado porque la zona líquida, después de la
separación, es combinada con el substrato para la
enzima del ligando enlazado con enzima, y se determina
la cantidad de ligando mediante el cambio en la can-
tidad del substrato.

10 20ª.- Método según la reivindicación 18ª,
caracterizado porque la enzima del ligando enlazado
con enzima no es inhibida substancialmente cuando
está enlazada al receptor a través del ligando, y en
el cual el receptor enlazado a un soporte es combina-
15 do en una segunda zona líquida con substrato para la
enzima, y se determina la cantidad de ligando median-
te el cambio en la cantidad del substrato.

20 21ª.- Método según la reivindicación 17ª,
caracterizado porque se ha provisto una columna del
receptor enlazado a un soporte y la zona líquida es
formada dentro de la columna introduciendo en la co-
luna una solución del medio y el ligando enlazado con
enzimas, y el efluente de la columna es combinado con
el substrato de la enzima, y se determina la cantidad
25 de ligando mediante el cambio en la cantidad del sub-



16 MAYO 1975

trato.

22ª.- Método según la reivindicación 17,
caracterizado porque el receptor enlazado a un soporte,
el medio y el ligando enlazado con enzima son combinados
5 para formar una mezcla, de modo que el ligando en el medio y el ligando enlazado con enzima compitan por el receptor; filtrar la mezcla y analizar el filtrado para su actividad enzimática.

23ª.- Método según la reivindicación 17ª,
10 caracterizado porque el ligando es un alcaloide, esteroide, cocaína, amfetamina, prostaglandina, tranquilizador, alucinógeno, vitamina, barbiturato, glutetímida, serotonina, metadona, meperidina, catecolamina, derivado del cannabino, polipéptido, proteína, difenilhidantoina,
15 análogo fisiomimético y metabolito del mismo.

24ª.- Método según la reivindicación 1ª,
caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima útil en los inmunoensayos, y el cual es un alcaloide o un análogo fisiomimético de un alcaloide enlazado
20 a una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima, que tiene como estructura esquelética mínima una estructura de la fórmula:

25

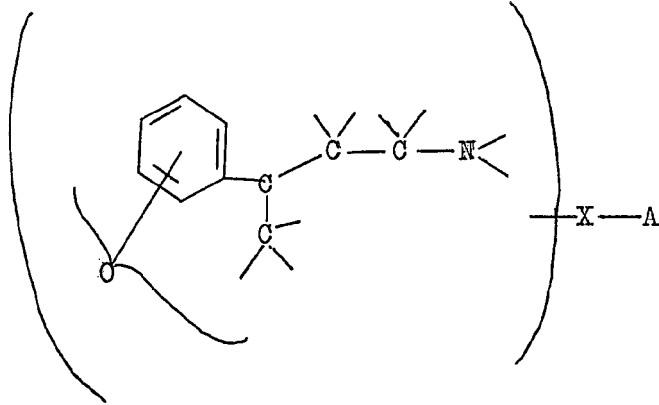
mte

13-5-75



16 MAY 1975

5



10

en la cual X es un grupo de enlace, A es una enzima, el oxígeno está ligado a una o más de las posiciones orto, meta o beta para proveer una o más funcionalidades oxi y las valencias restantes son satisfechas por carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, y A tiene un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de A dividido entre 2000.

15

20

25a.- Método según la reivindicación 24a, caracterizado porque el ligando enlazado a una enzima tiene la fórmula:

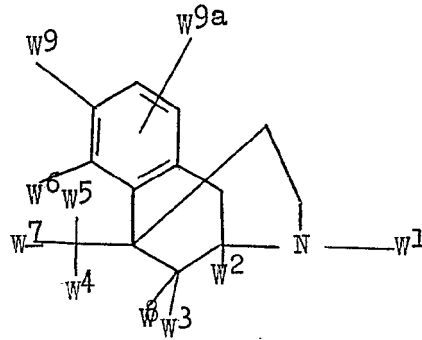
25

mge

13-5-75



5



10

15

20

25

en la cual cualquiera de los grupos W es $-X^x-A^x$, o un H de cualquiera de los grupos W está reemplazado por $-X^x-A^x$, en donde X^x es un enlace o grupo de enlace y A^x es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo A^x un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de A dividido entre 2,000; y W^1 es hidrógeno o hidrocarburo de 1 a 8 átomos de carbono; W^2 es hidrógeno; W^3 es hidrógeno; W^4 es hidrógeno o, tomado junto con W^3 un radical divalente de 3 a 6 átomos de carbono y de 0 a 2 átomos de oxígeno, que forma un anillo carbocíclico de 6 miembros con la cadena de carbono a la cual están enlazados; W^5 es hidrógeno o hidroxilo; W^6 es hidrógeno, hidroxilo o, tomado junto con W^5 es oxi; W^7 es hidrógeno o metilo; W^8 es hidrógeno o hidroxilo; W^9 es hidró-

mfe

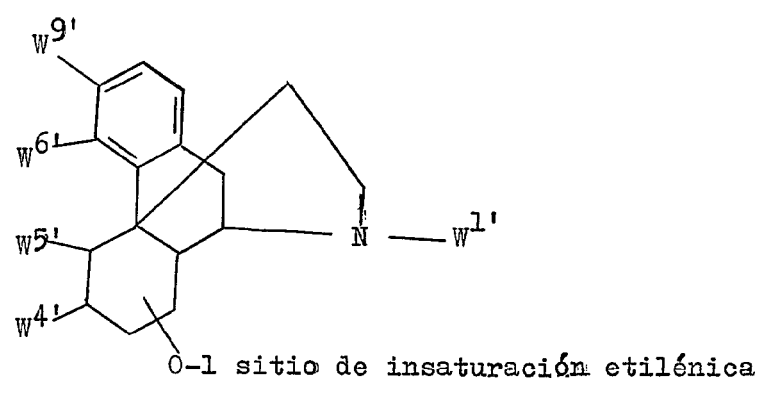


16 MAYO 1975

geno, hidroxilo, aciloxi de 1 a 6 átomos de carbono, hidrocarbiloxi de 1 a 3 átomos de carbono, 2-(N-morfolino)etoxi y glucuronilo; y W^{9a} es hidrógeno.

26a.- Método según la reivindicación 24a, caracterizado porque el ligando enlazado a una enzima tiene la fórmula:

10



15

en donde cualquiera de los grupos W es -X^z-A^z, o un H de cualquiera de los grupos W está reemplazado por -X^z-A^z, en donde X^z es un enlace o un grupo de enlace y A^z es una enzima enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo A^z un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de A^z dividido entre 2000; y W^{1'} es alquilo de 1 a 3 átomos de carbono; W^{4'} es hidrógeno, hidroxilo, oxo o acetoxi;

25

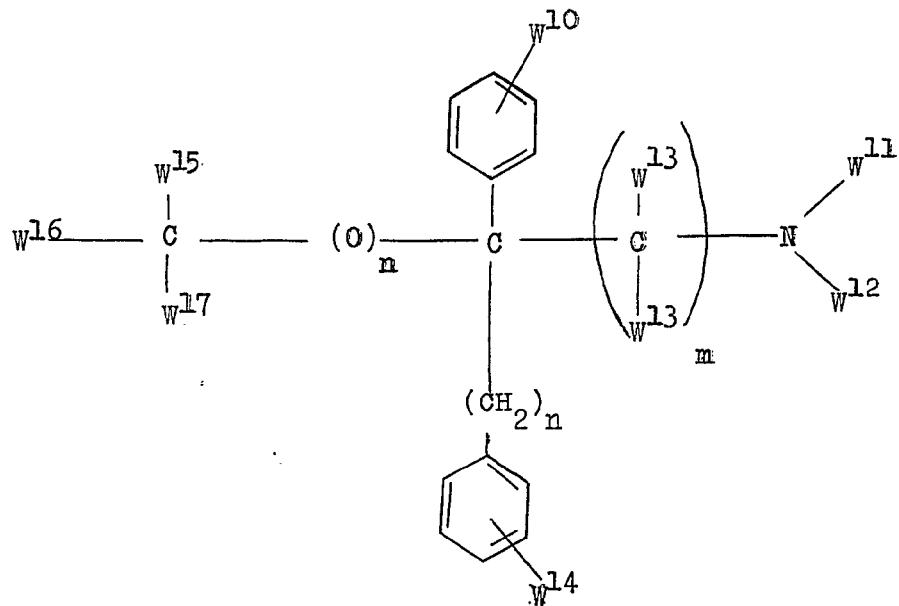
me



W^{5'} es hidrógeno o hidroxilo; W^{6'} es hidrógeno, hidroxilo, o tomados junto con W^{5'} es oxi (-O-); y W^{9'} es hidroxilo o alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono.

27a.- Método según la reivindicación 1a,
 5 caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es metadona o un análogo fisiomimético enlazado a través de un grupo de enlace a una enzima en un sitio que no sea su sitio reactivo de la enzima, y el cual tiene la siguiente fórmula:

10



15

20

25

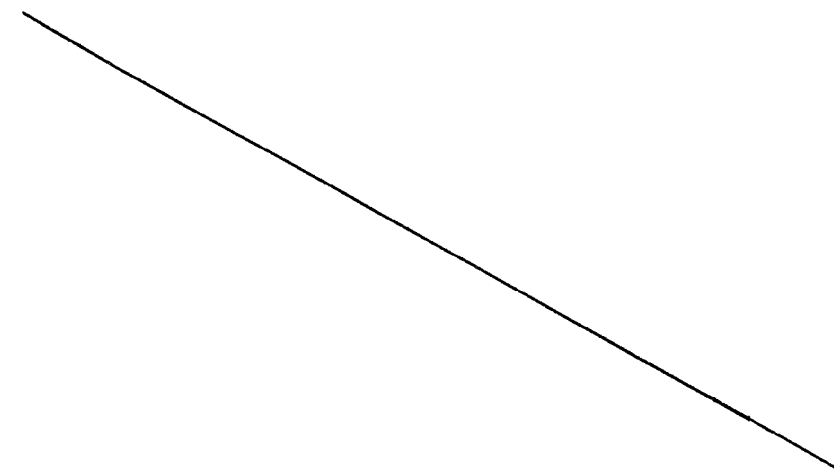
en donde: cualquiera de los grupos W es -X^x-A^x, o un H de cualquiera de los grupos W está reemplazado por -X^x-A^x, en donde X^x es un enlace o un grupo de enla-

mg



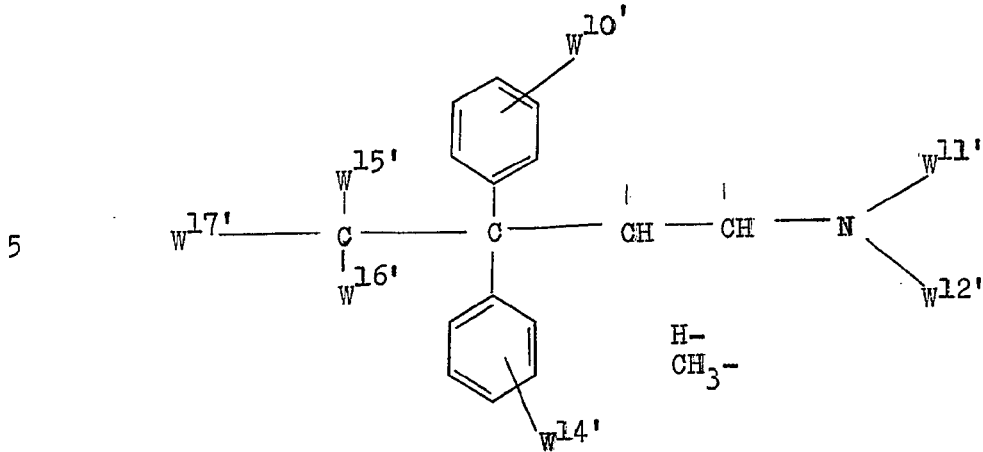
ce, y A^x es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de A^x dividido entre 2000; y n es 0 ó 1; m es 2 ó 3; W^{10} es hidrógeno; W^{11} y W^{12} son hidrógeno, alquilo de 1 a 3 átomos de carbono o pueden ser tomados juntos para formar un anillo de 6 miembros con el átomo de nitrógeno al cual están enlazados, teniendo de 0-1 heteroátomos anulares que no sean el átomo de nitrógeno; W^{13} es hidrógeno o metilo, siendo sólo uno de W^{13} metilo; W^{14} es hidrógeno; W^{15} es hidrógeno o hidroxilo; W^{16} es hidrógeno, aciloxi de 1 a 3 átomos de carbono o hidroxilo; y W^{17} es hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono.

28ª.- Método según la reivindicación 27ª, caracterizado porque el ligando enlazado a una enzima tiene la fórmula



mE

16 MAR 1975



10

en donde cualquiera de los grupos W o un H de cualquiera de los grupos W puede ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o un grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y $W^{10'}$ y $W^{14'}$ son hidrógeno; $W^{11'}$ y $W^{12'}$ son metilo o son tomados junto con el átomo de nitrógeno con el cual estén enlazados, para formar un anillo morfolino o piperidino; $W^{15'}$ y $W^{16'}$ son hidrógeno, hidróxi o acetoxi, siendo cuando menos uno hidróxi o acetoxi; y $W^{17'}$ es alquilo de 1 a 3 átomos de carbono.

25 29^a.- Método según la reivindicación 1^a, caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima

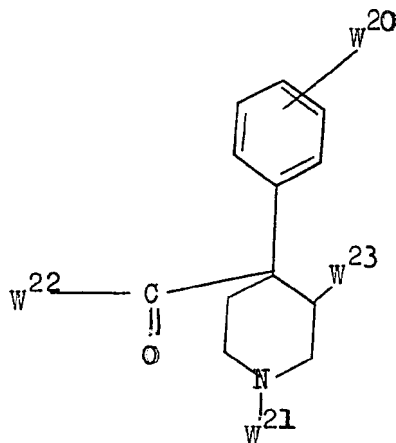
ME

16

y el cual es meperidina o un análogo fisiomimético enlazado a una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima, y el cual tiene la siguiente fórmula:

5

10



15

en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 con el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y W^{20} es hidrógeno; W^{21} es hidrógeno, alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, fenilaminoalquil o aminofenilalquil; W^{22} es alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono; y W^{23} es hidrógeno o metilo.

20

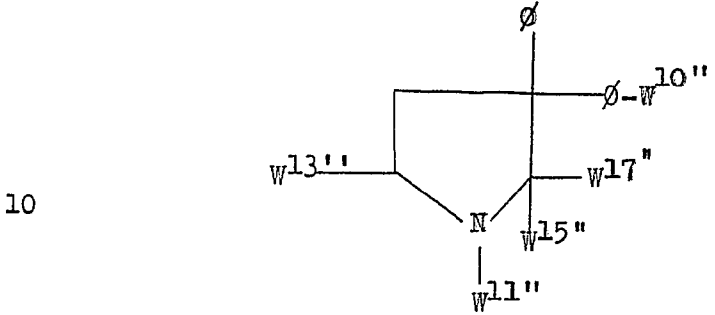
25

30a.- Método según la reivindicación 1a,

me



5 caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es un metabolito de metadona o análogo fisiomimético enlazado a través de un grupo de enlace a una enzima en un sitio que no sea su sitio reactivo de la enzima, y el cual tiene la siguiente fórmula:



15 en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la

20 gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y ϕ es fenilo; $W^{10''}$ es hidrógeno; $W^{11''}$ es hidrógeno, metilo o una valencia libre unida con $W^{15''}$; $W^{13''}$ es hidrógeno o metilo; $W^{15''}$ es hidrógeno, hidroxi, o tomado junto con $W^{15''}$ forma un doble enlace; y

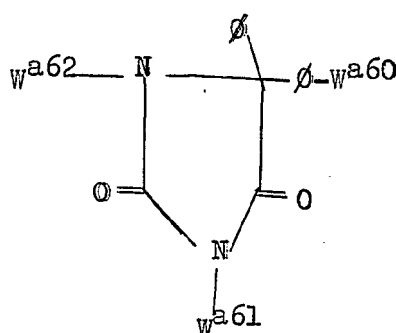
25 $W^{17''}$ es alquilo de 1 a 3 átomos de carbono.

ME



16 MAR 1975

31ª.- Método según la reivindicación 1ª,
 caracterizado porque el ligando es enlazado a una
 enzima y el cual es una difenilhidantoína enlazada
 a una enzima a través de un grupo de enlace en un
 sitio que no sea su sitio reactivo y que tiene la fór-
 mula:



15

en la cual cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un
 H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por
 $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y
 $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su
 sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la
 gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre
 2000; y W^{a60} , W^{a61} y W^{a62} son hidrógeno.

32ª.- Método según la reivindicación 1ª,
 caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzi-
 ma y el cual es una catecolamina enlazada a una enzima

13-5-75

- 162 -

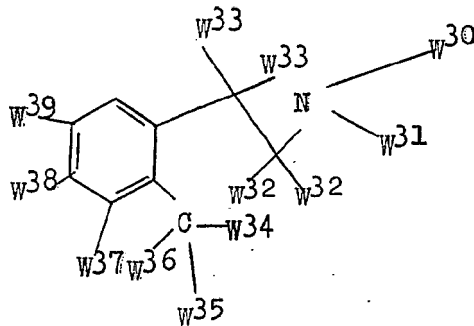
mE



16 MAR 1975

a través de un grupo de enlace en un sitio que no es su sitio reactivo y tiene la fórmula:

5



10

en la cual cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un H cualquiera de los grupos W está reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y A es una enzima, elazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y W^{30} es hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono; W^{31} es hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono; W^{32} y W^{33} son hidrógeno; W^{34} es hidrógeno, hidroxil, dimetoxicarboxifenacil y dimetoxi- α -ftalidil; W^{35} y W^{36} son hidrógeno o pueden ser tomados juntos con W^{31} para formar un enlace, siempre y cuando que cuando W^{31} y W^{35} son tomados juntos para formar un enlace, cada par de W^{32} y W^{33} y de W^{30} y W^{36}

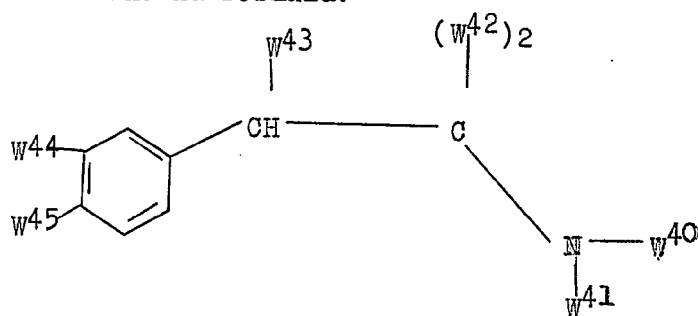
15
20
25

mle

pueden ser tomados juntos para formar un doble enlace; W^{37} es hidrógeno o alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono; y W^{38} y W^{39} son hidroxilo o alcoxi de 1 a 3 átomos de carbono.

5 33a.- Método según la reivindicación 1a, caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es una epinefrina o un análogo fisiomimético enlazado a una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo en la enzima y el cual tiene la fórmula:

10



15

en la cual cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y W^{40} y W^{41} son hidrógeno o alquilo de 1 a 3 átomos de carbono; W^{42} es igual o diferente y es hidrógeno, alquilo de 1 a 3 átomos de carbono o carboxi, o un

20

25

me

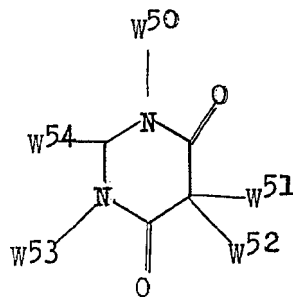


16 MAYO 1975

W^{42} puede ser tomado junto con W^{41} para formar un anillo de piperidina; W^{43} es hidrógeno, hidroxilo o carboximetilo, y W^{44} y W^{45} son hidrógeno, hidroxilo o alcóxido de 1 a 3 átomos de carbono.

5 34ª.- Método según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es un barbiturato enlazado a una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo en la enzima, y que tiene la fórmula:

10



15

en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y W^{50} es hidrógeno, alquilo de 1 a 3 átomos de carbono o catión de metal alcalino; W^{51} y W^{52} son

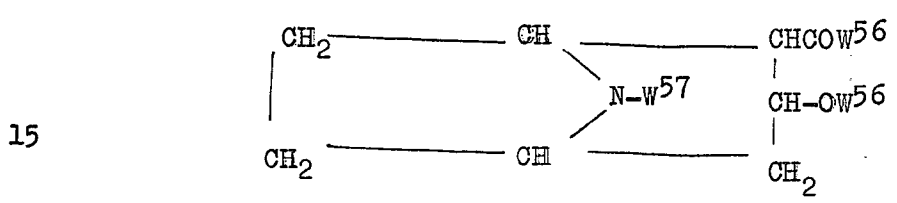
20

25

mG

hidrógeno, alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o hidrocarburo arilo de no más de 8 átomos de carbono; W^{53} es hidrógeno o catión de metal alcalino; y W^{54} es oxígeno o azufre.

5 35a.- Método según la reivindicación 1a, caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es cocaína o un compuesto relativo enlazado a una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima, y el
10 cual tiene la fórmula:



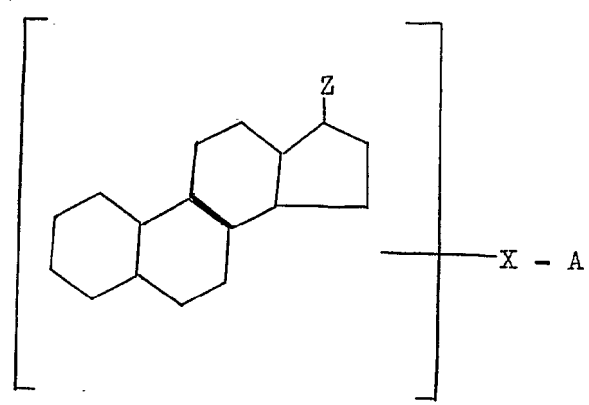
20 en la cual cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y W^{55} es hidroxilo, metoxi y amino; W^{56} es hidrógeno o benzóilo; y W^{57} es hidrógeno o alquilo de
25

16 MAY 1975

1 a 3 átomos de carbono.

36ª.- Método según la reivindicación 1ª,
caracterizado porque el ligando es enlazado a una
enzima y el cual es un esteroide de 18 a 27 átomos
de carbono y tiene de 1 a 6 funcionalidades que con-
tienen oxígeno y está enlazado a una enzima a través
de un grupo de enlace en un sitio que no sea el si-
tio reactivo de la enzima, y el cual tiene una estruc-
tura esquelética mínima de la fórmula:

10
15



en donde X es un enlace o un grupo estable de enlace,
y Z representa de 1 a 2 grupos, uno de los cuales es
hidroxi, oxo, hidrocarburo alifático de 1 a 8 átomos
de carbono o un grupo alifático oxigenado que tenga
de 1 a 8 átomos de carbono y de 1 a 3 átomos de oxí-
geno, y A es una enzima enlazada a X en un lugar que
no sea el sitio reactivo de esa enzima, teniendo A un
número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso mole-

ME

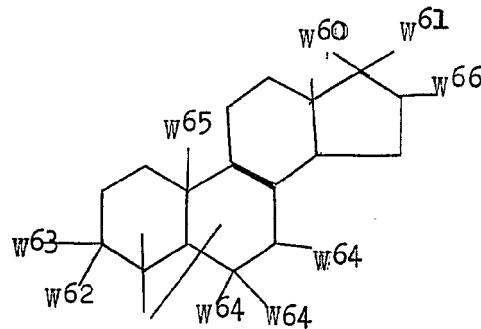
16 MAY 1975

cular de A dividido entre 2000.

37^a.- Método según la reivindicación 36^a,
caracterizado porque el ligando enlazado a una enzi-
ma es un andrógeno de la fórmula:

5

10



O-1 sitio de insaturación etilénica

15

en la cual cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, y un
H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por
 $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o un grupo de enlace
y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea
su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en
la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido
entre 2000 y W^{60} es hidrógeno o hidroxilo; W^{61} es hi-
drógeno, metilo o hidroxilo; W^{62} y W^{63} son hidrógeno
o hidroxilo, y cuando menos uno de W^{60-63} es hidroxilo;
15 W^{64} es hidrógeno o dos W^{64} pueden ser tomados jun-
tos para formar un enlace doble; W^{65} es metilo y W^{66}

20

25

13-5-75

- 168 -

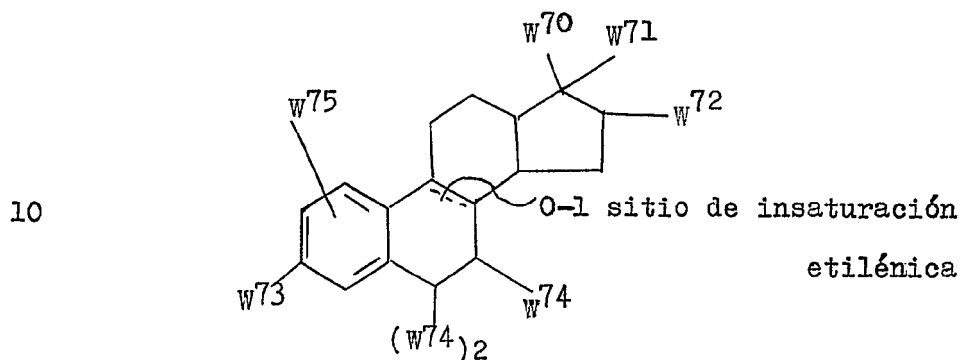
ME



es hidrógeno.

38ª.- Método según la reivindicación 36ª, caracterizado porque el ligando enlazado a una enzima es un estrógeno de la fórmula:

5



15 en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o un grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos
20 en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y W^{70} es hidrógeno o hidroxilo; W^{71} es hidrógeno, etinilo o hidroxilo; W^{72} es hidrógeno o hidroxilo; W^{73} es hidroxilo o alcóxido de 1 a 3 átomos de carbono; W^{74} es hidrógeno o dos W^{74} pueden ser
25 tomados juntos para formar un doble enlace; y W^{75} es

ME



16 MAY 1973

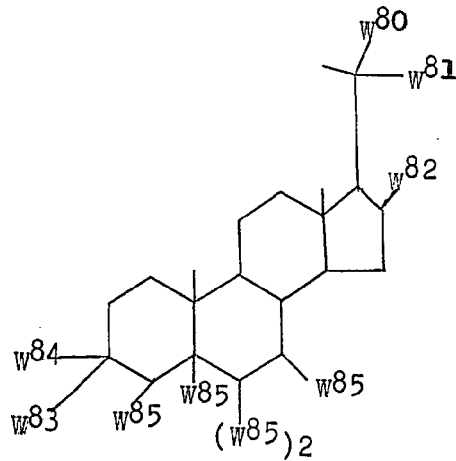
hidrógeno.

39ª.- Método según la reivindicación 36ª,
caracterizado porque el ligando enlazado a una enzi-
ma es un gestógeno de la fórmula:

5

10

15



20

25

en la cual cualquiera de los grupos W es $-X^* - A^*$, o un
H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por
 $-X^* - A^*$, en donde X^* es un enlace o grupo de enlace y
 A^* es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su
sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la
gama de 1 hasta el peso molecular de A^* dividida entre
2000; W^{80-84} son hidrógeno o hidroxilo, siendo por lo
menos dos, hidroxilo; W^{85} son hidrógeno o se pueden

ME

13-5-75



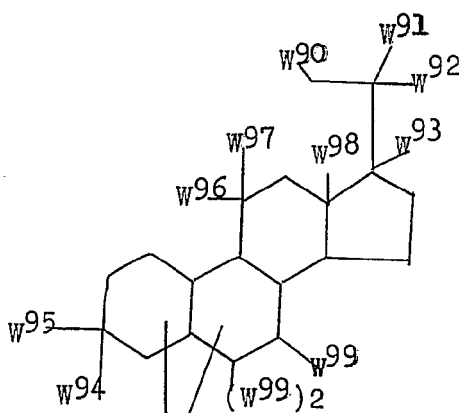
16 MAYO 1975

tomar dos W^{85} juntos para formar un doble enlace.

40ª.- Método según la reivindicación 36ª, caracterizado porque el ligando enlazado a una enzima es un corticosteroide de la fórmula:

5

10



0-1 sitios de insaturación etilénica

15

20

25

en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y W^{90-97} son hidrógeno o hidroxilo y por lo menos dos de ellos son hidroxilo; W^{98} es metilo o formilo; y W^{99} es hidrógeno o dos W^{99} puede ser tomados

MCE

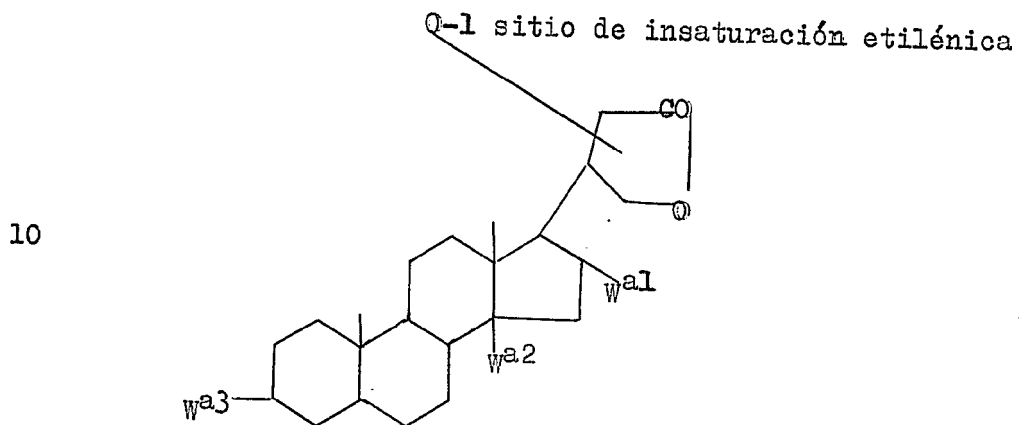


16 MAYO 1975

juntos para formar un doble enlace.

41ª.- Método según la reivindicación 36ª, caracterizado porque el ligando enlazado a una enzima es una sapogenina de la fórmula:

5



15 en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un H de cualquiera de los grupos W está reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la

20 gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y w^{a1} , w^{a2} , w^{a3} , son hidrógeno o hidroxilo, y por lo menos uno es hidroxilo.

25 42ª.- Método según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es un cannabinoide compuesto relacio-

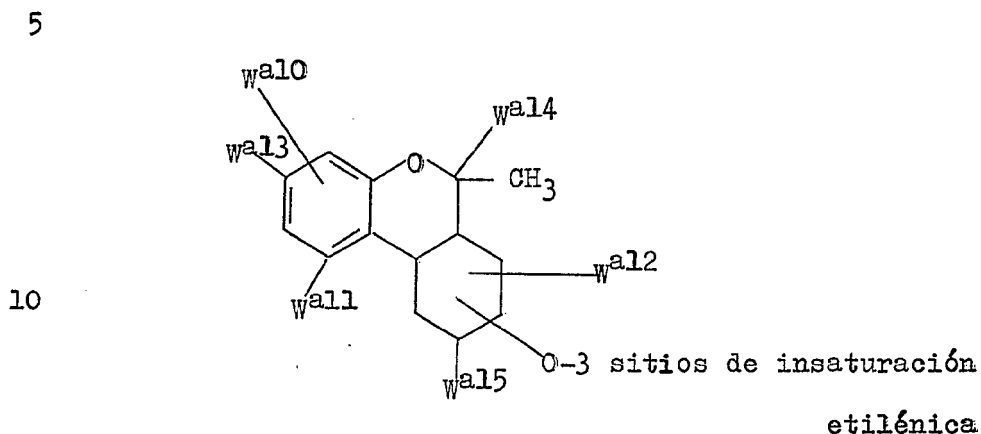
13-5-75

- 172 -

ME

16 MAR 1976

nado enlazado a una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima, y el cual tiene la fórmula:



en donde cualquiera de los grupos W es $-X^* - A^*$, o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^* - A^*$, en donde X^* es un enlace o grupo de enlace y A^* es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de A^* dividido entre 2000; y W^{a10} es hidrógeno carboxilo; W^{a11} es hidroxilo; W^{a12} es hidrógeno; W^{a13} es pentilo; W^{a14} es metilo; y W^{a15} es metilo o carboxi.

15

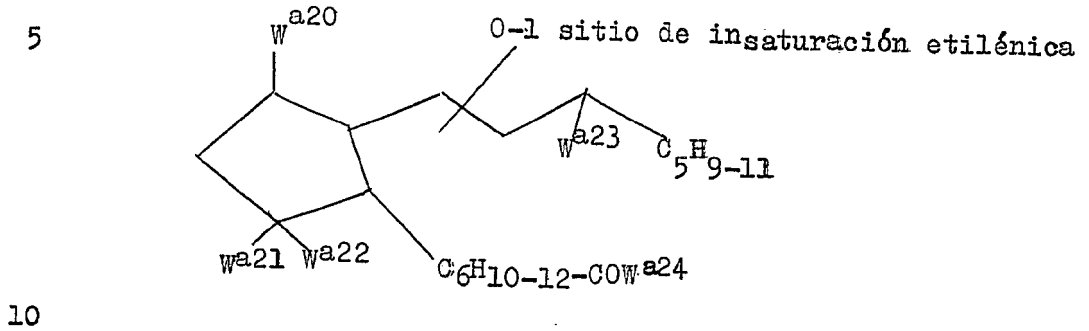
20

43ª.- Método según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es una prostaglandina enlazada a

25


 16 MAYO 1975

una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima, y el cual tiene la fórmula:



en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y $W^{a20-a23}$ son hidrógeno o hidroxilo, siendo cuando menos uno hidroxilo; y W^{a24} es hidroxilo, amino o un grupo oxi de 1 a 6 átomos de carbono.

15

20

44a.- Método según la reivindicación 1a, caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es un meprobamato o compuesto relativo enlazado a una enzima a través de un grupo de

25

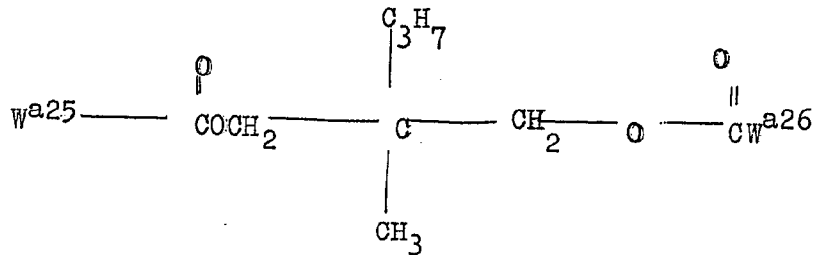
mge



16 MAYO 1975

enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima, y el cual tiene la fórmula:

5



10

en donde cualquiera de los grupos W es $-\text{X}^{\text{x}}-\text{A}^{\text{x}}$, o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-\text{X}^{\text{x}}-\text{A}^{\text{x}}$, en donde X^{x} es un enlace o grupo de enlace y A^{x} es una enzima enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de A^{x} dividido entre 2000; y Wa^{25} y Wa^{26} son amino.

15

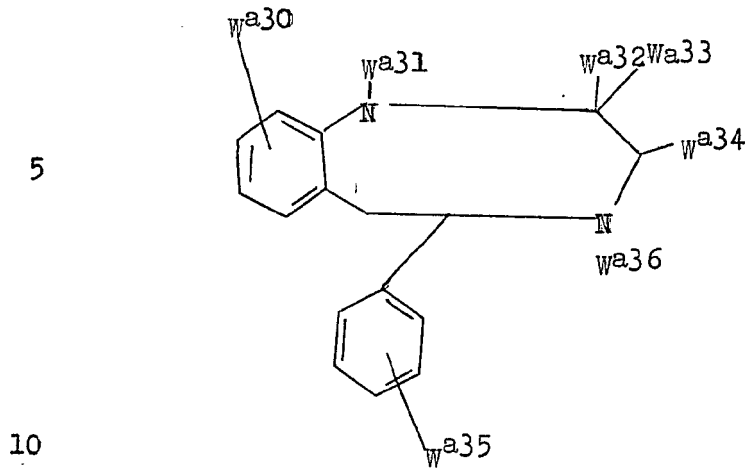
20

45a.- Método según la reivindicación 1a, caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es un tranquilizador que tenga una funcionalidad benzodiazocicloheptano o compuesto relacionado enlazado a una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima, y el cual tiene la fórmula:

25

mte

16 MAR 1976



15 en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un grupo de enlace o un enlace, y $A^{\#}$ es una enzima enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; y W^{a30} y W^{a35} son hidrógeno; W^{a31} es hidrógeno, alquilo inferior de 1 a 3 átomos de carbono o puede ser tomado junto con W^{a32} para formar un enlace doble entre los átomos de carbono y de nitrógeno; W^{a33} es amino o alquilamino inferior de 1 a 3 átomos de carbono o puede ser tomado junto con W^{a32}

20

25

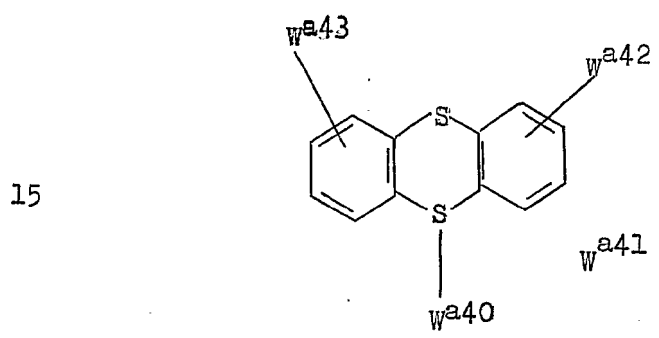
ME

13-5-75

16 MAY 1975

para formar un carbonilo; W^{a34} es hidrógeno o hidroxilo; y W^{a36} es oxi o un par de electrones no compartidos.

46a.- Método según la reivindicación la,
5 caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzima y el cual es un tranquilizador que tenga una funcionalidad fenotiazina o compuestos relacionados enlazados a una enzima a través de un grupo de enlace en un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima,
10 el cual tiene la fórmula:



en donde cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$ o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima, enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre
20 2000; W^{a40} es hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos
25

mE



16 MAYO 1975

de carbono, dialquilaminoalquil de 4 a 8 átomos de
carbono, N-hidroxiálquil, N'piperazinoalquil, en don-
de el alquilo tiene de 2 a 3 átomos de carbono, N-al-
quil, N'-piperazinoalquil, en donde el alquilo tiene
5 de 1 a 3 átomos de carbono y 2-(N-alquil)-piperidinil-
alquil, en donde el alquilo tiene de 1 a 3 átomos de
carbono, habiendo cuando menos 2 átomos de carbono
entre los heteroátomos; W^{a41} es hidrógeno, cloro, tri-
fluorometil, alquilmercapto de 1 a 3 átomos de carbo-
10 no o acilo de 1 a 3 átomos de carbono; y W^{a42} y W^{a43}
son hidrógeno.

47ª.- Método según la reivindicación 1ª,
caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzi-
ma y el cual es una serotonina o compuesto relaciona-
15 do, el cual es 3-(2'-aminoetil)-5-hidroxiindolo, en
donde uno de los hidrógenos de los grupos amino o el
hidroxilo de los grupos de los grupos carboxilo puede
ser reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace
o un grupo de enlace, y $A^{\#}$ es una enzima enlazada en
20 un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un
número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso mole-
cular de $A^{\#}$ dividido entre 2000.

48ª.- Método según la reivindicación 1ª,
caracterizado porque el ligando es enlazado a una enzi-
25 ma y el cual es glutetimida o compuesto relacionado

13-5-75

- 178 -

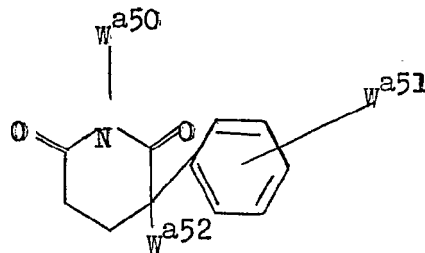
ME



10-11-1975

enlazado a una enzima a través de un grupo de enlace de un sitio que no sea el sitio reactivo de la enzima, y el cual tiene la fórmula:

5



10

en la cual cualquiera de los grupos W es $-X^{\#}-A^{\#}$, o un H de cualquiera de los grupos W es reemplazado por $-X^{\#}-A^{\#}$, en donde $X^{\#}$ es un enlace o grupo de enlace y $A^{\#}$ es una enzima enlazada en un sitio que no sea su sitio reactivo, teniendo un número de ligandos en la gama de 1 hasta el peso molecular de $A^{\#}$ dividido entre 2000; w^{a50} y w^{a51} son hidrógeno; y w^{a52} es alquilo inferior de 1 a 3 átomos de carbono.

20

49ª.- Método según cualesquiera de las reivindicaciones 24ª, 25ª, 27ª, 33ª, 34ª, 35ª ó 36ª, caracterizado porque la enzima es lisozima, amilasa, peroxidasa, dehidrogenasa del manitol 1-fosfato, dehidrogenasa del malato, β -glucoronidasa, celulasa o fos-

25

m6

16 MAY 1975

folipasa.

50ª.- Método según cualquiera de las reivin-
dicaciones 24ª, 25ª, 27ª, 33ª, 34ª ó 35ª, caracteri-
zado porque la enzima es lisozima, amilasa, peroxida-
sa o dehidrogenasa del malato.

51ª.- Método mejorado para determinar la
presencia de compuestos biológicamente activos emplean-
do una enzima modificada.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que
antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de ciento ochenta hojas
escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

16 MAYO 1975

15

P.A.

Alberto de Eizaburu
Por Poder,



20

25

13-5-75

- 180 -

RRA

me