

19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	26-5-1.983	



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
383.340	27 de Mayo de 1.982	EE.UU. de América.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G 01 N 33/54	

54 TITULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO DE INMUNOANALISIS PARA DETERMINAR PROPRANOLOL EN UNA MUESTRA DE ANALISIS.

71 SOLICITANTE (S)

MILES LABORATORIES, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1127 Myrtle Street, Elkhart Indiana, 46514, EE.UU. de América.

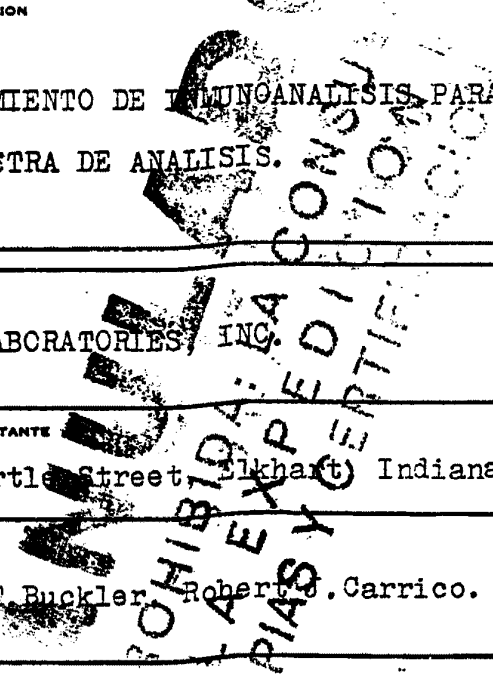
72 INVENTOR (ES)

Robert T. Buckler, Roberto J. Carrico.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO y POMBO.



Para que produzca sus efectos característicos deseados, una droga farmacológicamente activa debe estar presente en concentraciones adecuadas en sus puntos de acción. La concentración de una droga in vivo no solo es una función de la cantidad de droga administrada, sino también una función del grado y velocidad de su adsorción, distribución, ligación en los tejidos, biotransformación y excreción. Con el fin de determinar la dosis adecuada para lograr eficacia terapéutica, es necesario determinar el nivel de la droga en un fluido fisiológico, por ejemplo, sangre u orina.

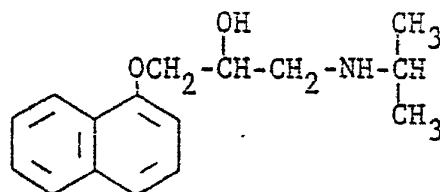
La determinación de drogas puede llevarse a cabo por diversas técnicas, incluyendo fluorometría, cromatografía gas-líquido, espectroscopia de masa y análisis de ligación de proteína competitivos ("inmunoanálisis"). La técnica de inmunoanálisis para la determinación del nivel de droga en fluidos fisiológicos a llegado a utilizarse cada vez más para una amplia variedad de drogas, debido a que tales técnicas son extremadamente sensibles, específicas y técnicamente adaptables al procesado de muestras químicas. Las técnicas de inmunoanálisis implican el empleo de anticuerpos que son específicos a la droga, es decir, que se unen con alta afinidad a la droga, pero no se unen, o lo hacen debilmente, con drogas y metabolitos relacionados que pueden estar presentes en el fluido fisiológico.

Un hapteno se define como una pequeña molécula que por sí mismo no puede estimular la producción de anticuerpos, pero puede estimular la producción de anticuerpos cuando se combina con un vehículo o soporte inmunogénico. El estado de la técnica para la preparación de anticuerpos a haptenos, tales como drogas, es representado por Weinryb et. al., Drug Metabolism Reviews, 10(2): 271 (1979); Playfair et. al., Br. Med. Bull.

30:24 (1974); Broughton et. al., Clin. Chem., 22/6:726 (1976);
y Butler, J. Immunol. Meth., 7:1 (1975).

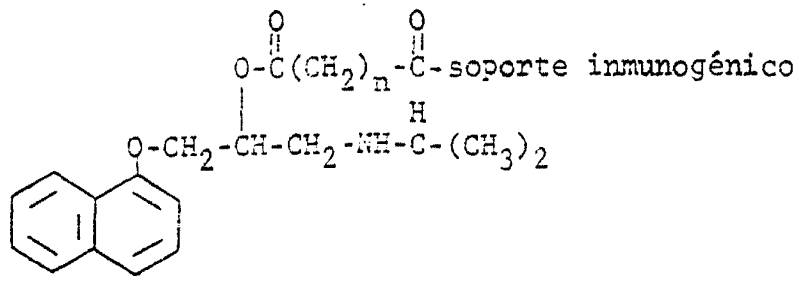
Un tipo de droga que puede ser analizado por dichas técnicas es propanolol.

5 El propanolol es un inhibidor β -adrenérgico de fórmula:



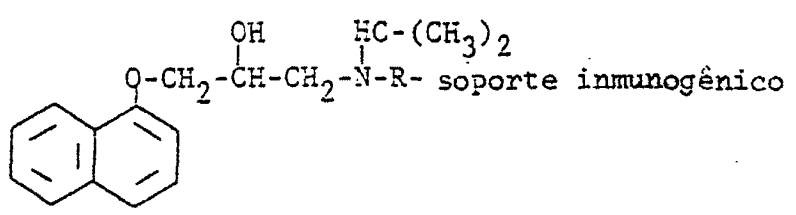
10 El propanolol se utiliza ampliamente en la terapia de numerosos desórdenes, incluyendo hipertensión, perturbaciones del ritmo cardiaco, angina de pecho e hipertiroidismo. Se ha encontrado que la variabilidad individual en el nivel de propanolol presente en el plasma, incluso a los mismos niveles de dosificación, es común. Igualmente, existe una gran variabilidad en el grado en el cual la droga es metabolizada en el hígado. Por tanto, no siempre es posible predecir la concentración de plasma o el efecto de propanolol después de administrar una dosis particular. Debido a estos factores, la técnica de inmunoanálisis ha resultado ser un método clínicamente útil para determinar niveles de propanolol en el sistema circulatorio.

20 La patente USA No. 4.026.879 está relacionada con un inmunógeno de propanolol que es propanolol acoplado en el grupo hidroxilo a través de un brazo de puente a un material de soporte inmunogénico. El inmunógeno reivindicado tiene la estructura:

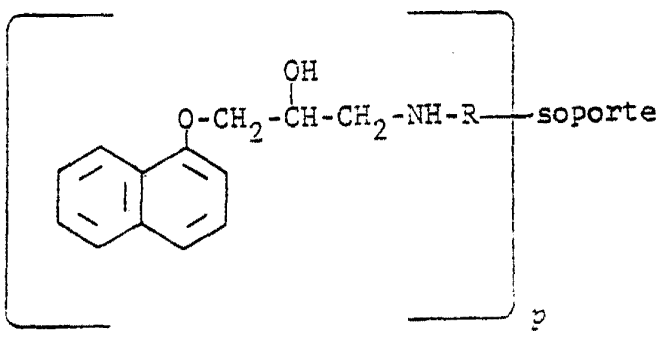


La patente USA No. 4.070.492 está relacionada con un anticuerpo de propanolol preparado por inyección a un animal anfitrión del inmunógeno reivindicado en la patente USA No. 4.026.879.

La patente USA 4.241.177 está dirigida a un inmunógeno de propanolol que es el propanolol acoplado en el nitrógeno amínico a través de un brazo de puente (R) a un material soporte inmunogénico. Los inmunógenos reivindicados tienen la estructura:

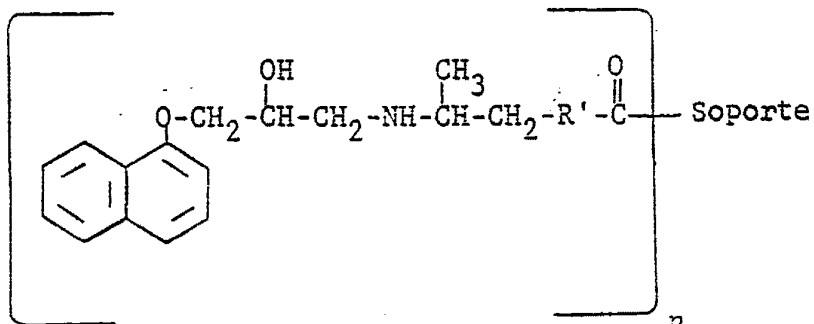


La presente invención proporciona reactivos para utilizarse en inmunoanálisis de propanolol. La invención incluye al inmunógeno 3-(1-naftoxi)-2-hidroxipropilamina de fórmula:



en donde R es un grupo de enlace, el soporte es un material soporte inmunogénico y p es el promedio de 1 a 50 aproximada-

mente; y el inmunógeno ácido 3-N-[2-hidroxi-3-(1-naftoxi)-1-propil]aminobutírico que tiene la fórmula:

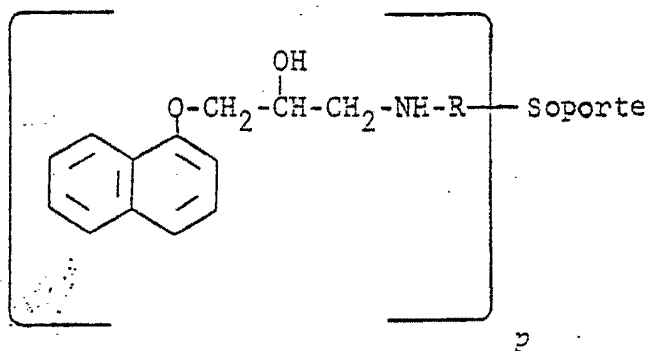


en donde R' es una mitad alquileno, alquenileno o fenileno que tiene de 1 a 12 átomos de carbono.

La invención incluye también anticuerpos preparados contra los inmunógenos anteriores; un conjugado marcado de ácido 3-N-[2-hidroxi-3-(1-naftoxi)-1-propil]aminobutírico; intermediarios utilizados en la síntesis de los inmunógenos anteriores; un método de inmunoanálisis; un equipo de análisis y un dispositivo de análisis.

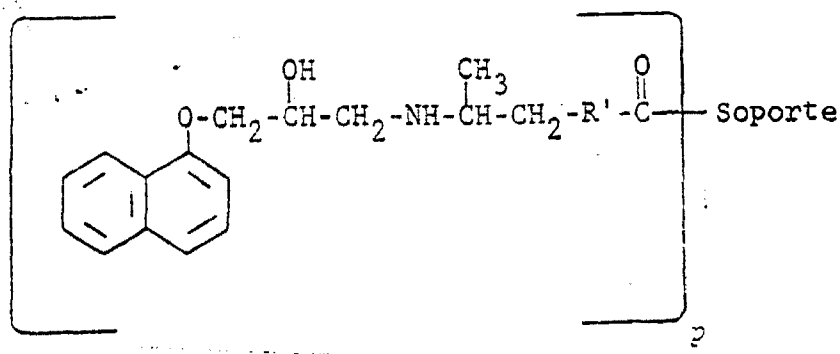
La presente invención se relaciona con un inmunoanálisis para propranolol, utilizando anticuerpos contra propranolol que se preparan por inyección, en un animal, de un inmunógeno que es un derivado de propranolol acoplado a un soporte inmunogénico. El derivado de propranolol es 3-(1-naftoxi)-2-hidroxipropilamina o ácido 3-N-[2-hidroxi-3-(1-naftoxi)-1-propil]aminobutírico acoplado a un soporte inmunogénico.

El inmunógeno del hidroxipropilamina tiene la fórmula:



en donde R, p y el soporte se definen como anteriormente.

El inmunógeno de ácido aminobutírico tiene la fórmula:



5 en donde R', p y el soporte se definen como anteriormente.

Alternativamente, el intermediario se puede emplear para formar conjugados marcados que sirven como los reactivos detectables en inmunoanálisis de propanolol.

10 El material soporte inmunogénico puede elegirse entre aquellos convencionalmente conocidos. En la mayoría de los casos será una proteína o polipéptido, aunque similarmente se pueden emplear otros materiales tales como carbohidratos, polisacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos y similares de suficiente tamaño e inmunogenicidad.

15 En su mayor parte, las proteínas y polipéptidos inmunogénicas tendrán pesos moleculares de 5.000 a 10.000.000, con preferencia superiores a 15.000 y más generalmente superiores a 50.000. En particular, las proteínas tomadas de una especie animal serán inmunogénicas cuando se introducen en la corriente sanguínea de otra especie. Proteínas particularmente
20 útiles son albúminas, globulinas, enzimas, hemocianinas, glutelinas, proteínas que tienen constituyentes no proteínicos importantes, por ejemplo, glicoproteínas, y similares. Las albúminas

y globulinas de peso molecular entre 3.000 y 200.000 son particularmente preferidas. Otra referencia al estado de la técnica relativo a los materiales soporte inmunogénicos y técnicas convencionales para acoplar haptenos a los mismos, puede ser:

5 Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, New Jersey USA, 1976); Butler, J. Immunol. Meth., 7:1 (1975); Weinryb y Shroff, Drug Metab. Rev., 10(2): 271 (1979); Broughton y Strong, Clin. Chem., 22(6): 726 (1976); y Playfair, et. al., Br. Med. Bull., 30:24
10 (1974).

La designación p se refiere al número promedio de residuos propanolol conjugados al soporte. El número p es a veces denominados como la densidad epitópica del inmunógeno y en la situación usual será como un promedio, de 1 a 50, más normalmente, de 1 a 25 aproximadamente. Las densidad epitópicas óptimas, considerando la facilidad y reproducibilidad de síntesis
15 del inmunógeno y respuesta de anticuerpo, serán de 2 a 20, más normalmente de 5 a 15 aproximadamente.

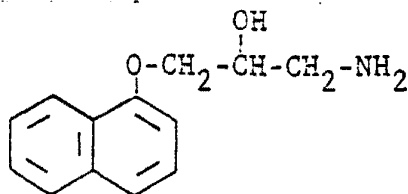
La hidroxipropilamina puede acoplarse al soporte
20 inmunogénico a través de un grupo de enlace R por técnicas bien conocidas. Por ejemplo, el grupo amino de la mitad droga puede unirse a soportes inmunogénicos conteniendo grupos amino, tal como proteínas, por reactivos difuncionales tal como tolueno-2,4-diisocianato [C. H. W. Hirs y S. N. Timasheff, Methods in Enzymol., 25 (Parte B):625 (1972)]; 4,4'-difluor-3,3'-dinitro-
25 difenilsulfona [P. Cuatrecasas, et al., J. Biol. Chem., 244:406 (1969)]; glutaraldehído [L. A. Frohman, et. al., Endocrinol., 87:1055 (1970)]; bis-imidoésteres [A. Dutton, et. al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 23:730 (1966)]; ó clorotriazina [G. Kay
30 y E. M. Crook, Nature, 216:514 (1967)].

Alternativamente, el grupo amino de la hidroxipropil amina puede acoplarse a funciones carboxilo presentes en el soporte mediante reacciones formadoras de enlaces péptidos convencionales, tal y como se describe en "Peptides" ed. Goodman y Meienhofer, John Wiley & Sons, (New York, 1977) p. 6 et seq. Adicionalmente, se puede introducir un grupo tiol en el derivado de droga por reacción del grupo amino con N-succimidil-3-(2-piridilditio)propionato [J. Carlsson, et. al., Biochem. J., 173:723 (1978)] y acoplarse este al soporte conteniendo tiol mediante la reacción de intercambio de disulfuros [Martin, et. al., Biochem., 20:4229 (1981)].

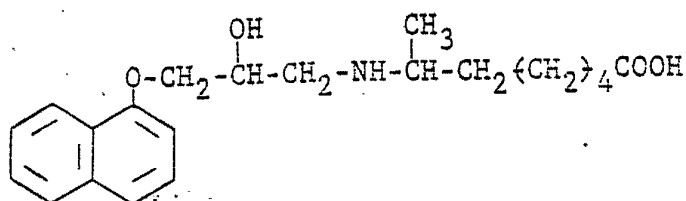
El ácido aminobutírico puede unirse directamente al soporte inmunógeno por técnicas ya conocidas. Por ejemplo, el ácido aminobutírico puede acoplarse a soportes inmunógenos a través de reacciones convencionales formadoras de enlaces péptidos (Goodman y Meienhofer, supra).

Alternativamente, la unión al soporte puede implicar el empleo de un "separador" R', como más abajo se describe, en donde R' puede ser de 1 a 12 átomos de carbono.

Cuando R' es alquileo, se puede emplear una reacción de alquilación reductiva. El compuesto

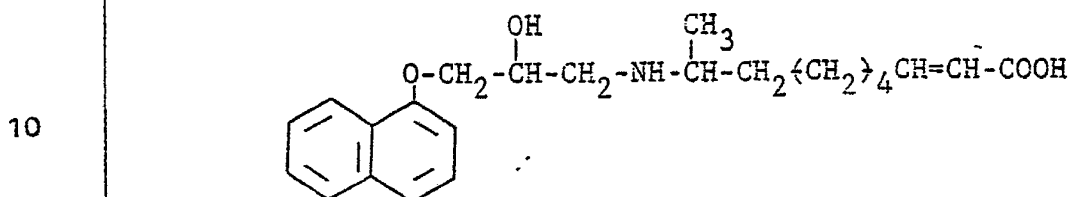


se puede hacer reaccionar con un ácido cetoalcanóico adecuado. Por ejemplo, la amina anterior y el ácido 7-ceto octanóico [O. wallach, Ann., 345:141 (1906)], en presencia de cianoborohidruro sódico [R. F. Borch, et al., J. Amer. Chem. Soc., 93:2897 (1971)] reaccionarán para dar



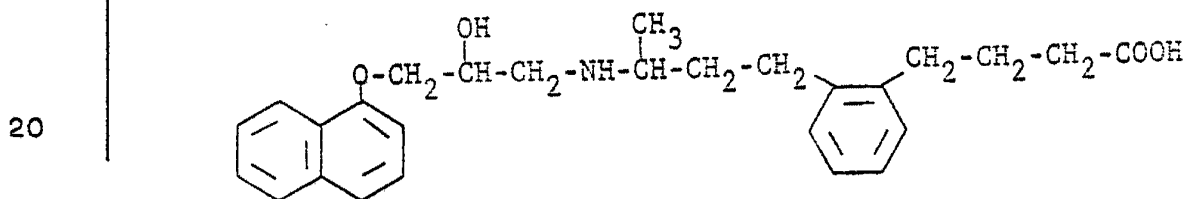
el cual puede unirse a los soportes conteniendo amina mediante reacciones formadoras de enlaces péptidos convencionales.

5 Cuando R' es alquenileno, la síntesis anterior puede modificarse para dar un grupo de enlace alquenileno mediante sustitución del ácido cetoalquenónico por un ácido cetoalcanónico. Por ejemplo, el empleo de ácido 9-oxo-2-decenónico [M. Barbier, et al., Compt. Rendu. 251:1135 (1960)] en la reacción de alquilación reductiva anterior proporcionará



el cual se puede unir a polímeros conteniendo amina.

15 Cuando R' es fenileno, se pueden modificar los ejemplos anteriores sustituyendo los ácidos cetoalcanónicos o cetoalquenónicos con el cetoácido aromático adecuado. Por ejemplo, el compuesto amino puede ser alquilado reductivamente con 4-[2-(3-carboxipropil)fenil]-2-butanona [R. T. Buckler, et al., European J. Med. Chem., 12:465 (1977)] para dar un derivado de propanolol carboxilo-funcionalizado que contiene un grupo fenileno en el brazo de enlace



Anticuerpos de propanolol

La preparación de anticuerpos específicos empleando los presentes conjugados inmunógenos pueden seguir cualquier técnica convencional. Se puede disponer de numerosos textos que describen los aspectos fundamentales de la inducción de la formación de anticuerpos, por ejemplo, puede hacerse referencia a Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-hall (Englewood Cliffs, New Jersey USA, 1976).

En el caso usual, un animal anfitrión, tal como un conejo, cabra, ratón, cobayo o caballo se inyecta en uno o más de diversos sitios con el conjugado inmunógeno, normalmente en mezcla con un adyuvante. Se efectúan otras inyecciones en el mismo sitio o en diferentes sitios a intervalos regulares o irregulares, tomándose a continuación sangrías para evaluar el título de anticuerpo hasta que se determina la consecución del título óptimo. El animal anfitrión es sangrado para dar un volumen adecuado de antisuero específico. Cuando sea conveniente, se pueden realizar etapas de purificación para separar material indeseado tal como anticuerpos no específicos antes de considerar el antisuero como adecuado para utilizarse en la realización de análisis reales.

Los anticuerpos se pueden obtener también mediante técnicas de hibridización de células somáticas, siendo denominados generalmente tales anticuerpos como anticuerpos monoclonales. Revisiones de tales técnicas de anticuerpos monoclonales pueden encontrarse en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers et al., Springer-Verlag (New York, 1978), Nature, 266:495 (1977), Science, 208:692 (1980), y Methods in Enzymology, 73(B):3 (1981).

Técnicas de inmunoanálisis

Los anticuerpos preparados a partir de 3-(1-naftoxi)

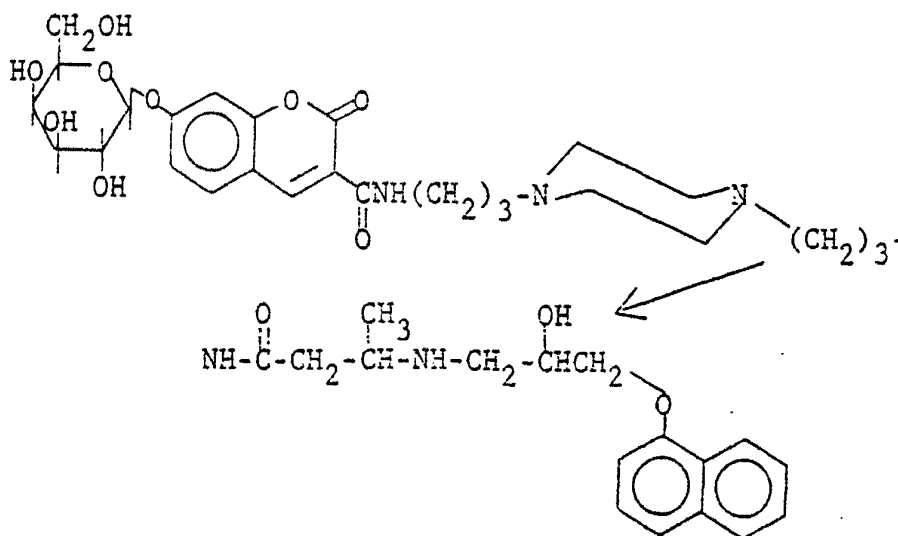
y ácido 3-N- $\sqrt{2}$ -hidroxi-3-(1-naftoxi)-1-propil/aminobutírico de la presente invención, se pueden utilizar en cualquier método de inmunoanálisis y los correspondientes medios reactivos, para determinar propranolol, incluyendo técnicas de aglutinación, radioinmunoanálisis, inmunoanálisis de enzimas heterogéneas (véase Patente USA 3.654.090), inmunoanálisis fluorescentes heterogéneos (véase Patentes USA Nos. 4.201.763; 4.171.311; 4.133.639 y 3.992.631) e inmunoanálisis homogéneos (separación-
menos). Estos últimos son particularmente preferidos e incluyen técnicas tales como enfriamiento o aumento de fluorescencia (véase Patente USA 4.160.016), polarización de fluorescencia [(véase J. Exp. Med., 122:1029 (1965))], inmunoanálisis marcados con sustratos enzimáticos (véase Patente USA 4.279.992) y Patente británica 1.552.609), inmunoanálisis marcados con grupos prostéticos (véase Patente USA 4.238.565), inmunoanálisis marcados con moduladores enzimáticos, por ejemplo empleando marcadores inhibidores (véase Patentes USA Nos. 4.134.792 y 4.273.866), inmunoanálisis marcados con enzimas (véase Patente USA 3.817.837), inmunoanálisis de transferencia de energía (véase patente USA 3.996.345), inmunoanálisis de fluorescencia químicamente excitada (véase Patente USA 4.238.195) e inmunoanálisis de impedimento estérico de doble anticuerpo (véase Patentes USA 3.935.074 y 3.998.943).

Además, la hidroxipropilamina y el ácido aminobutírico de la presente invención se pueden emplear para preparar los conjugados marcados necesarios para llevar a cabo los diversos inmunoanálisis anteriormente descritos. Los derivados adecuados pueden ser radiomarcados o marcados con mitades fluorescentes de acuerdo con métodos convencionales. Similarmente, la mitad marcadora adecuada para las técnicas homogéneas prefe-

ridas, por ejemplo, un sustrato enzimático, un grupo prostético, un modulador enzimático o un enzima (que es una proteína y puede acoplarse similarmente al soporte inmunogénico como antes se ha descrito) puede acoplarse a la hidroxilpropilamina para dar conjugados marcados.

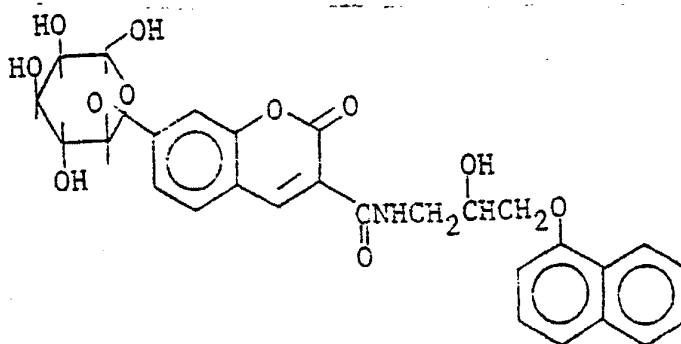
5

Un conjugado marcado preferido que implica al compuesto de ácido aminobutírico es el siguiente: β -galactosil-umbeliferona (β GU)-hidroxipropilamina-ácido butírico que tiene una mitad piperazina como grupo de enlace:



10

Un conjugado marcado preferido que implica al compuesto de hidroxipropilamina es el siguiente compuesto β GU:



Los medios reactivos de la presente invención comprenden a la totalidad de los elementos químicos esenciales requeridos para efectuar un método de inmunoanálisis de propanolol deseado abarcado por la presente invención. El medio reactivo se presenta en una forma comercialmente envasada, como una composición o mezcla en donde la compatibilidad de los reactivos permitirá, en una configuración de dispositivo de análisis o bien como un equipo de análisis, es decir una combinación envasada de uno o más recipientes, mantener a los reactivos necesarios. Incluidos en los medios reactivos se encuentran los reactivos adecuados para el sistema de reacción de ligación deseado, por ejemplo, un anticuerpo y un conjugado marcado de la presente invención. Desde luego, los medios reactivos pueden incluir otros materiales como ya se han conocido en la técnica y que pueden ser convenientes desde un punto de vista comercial y del usuario, tal como tampones, diluyentes, referencias y similares. En particular se prefiere un equipo de análisis para el inmunoanálisis de ligación competitiva homogénea de la presente invención que comprende (a) un anticuerpo de propanolol de la presente invención y, (b) un conjugado de hidroxipropilamina marcado que tiene una propiedad detectable que es alterada cuando se liga con el anticuerpo. También se prefiere un dispositivo de análisis que comprende una composición reactiva incluyendo un anticuerpo de propanolol de la presente invención y un conjugado de propanolol marcado que tiene una propiedad detectable que es alterada cuando se liga con el anticuerpo, y un elemento soporte sólido incorporado con la composición reactiva. Las diversas formas de tal dispositivo de análisis se describen en la solicitud de patente USA No. de serie 202.378 presentada el 30 de octubre de 1980, y la cual se incorpora aquí únicamente como referencia.

El marcador específico usado en el equipo de análisis y dispositivo de análisis preferidos dependerá de la técnica seguida, como anteriormente se ha descrito.

5 La presente invención será ilustrada ahora, pero no limitada, por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

A Preparación de 3-(1-naftoxi)-2-hidroxi-propilamina
(NHPA)

10 Se refluyen durante 5 horas, 20 g (0,14 moles) de 1-naftol, 38,6 g (0,42 moles) de epíclorhidrina y 0,4 ml de piperidina, tras lo cual se enfría a temperatura ambiente (véase J.Chem. Soc., 1571, 1954). La mezcla de reacción se evapora bajo presión reducida para dar un aceite que se recibe en 50 ml de CHCl_3 y se agita durante 90 minutos con 50 ml de ácido clorhídrico concentrado. La fase orgánica se separa, se lava con agua, se lava con solución saturada de cloruro sódico, se seca, se filtra y se evapora. El residuo se destila evaporativamente para dar 25 g (rendimiento 72 %) de la correspondiente clorhidrina como un aceite amarillo viscoso. Este
15 aceite se disuelve en 150 ml de dimetilformamida seca (DMF), se combina con 28 g (0,15 moles) de ftalimida potásica y la reacción se agita a reflujo durante un día. El disolvente se separa bajo presión reducida y el residuo semisólido se tritura con agua. El material insoluble presente se recristaliza
20 dos veces en etanol para dar 19 g (rendimiento 55 %) de 1-(1-naftoxi)-2-hidroxi-3-(N-ftalimida)propano como agujas blancas, p.f. 154°C.

30 Se refluye durante 4 horas, una solución de 15 g (43 mmoles) del ftalimidopropano obtenido anteriormente y 20 ml de hidrazina al 80 % en 150 ml de metanol. El disolven-

te metanol se separa bajo presión reducida y el residuo se agita durante 10 minutos en 300 ml de hidróxido sódico 0,5 N. El material insoluble presente se filtra y se lava con agua. El material insoluble se resuspende en 300 ml de agua y se agita durante 30 minutos. La filtración y secado al aire proporciona un sólido que se recristaliza en tolueno para dar 6 g (rendimiento 64 %) de 3-(1-naftoxi)-2-hidroxi-propilamina como placas blancas, p.f. 106°C.

Análisis: Calculado para $C_{13}H_{15}NO_2$: C, 71,86; H, 6,96; N, 6,45.
Encontrado: C, 71,98; H, 6,86; N, 6,24.

B Preparación de inmunógeno de albúmina de suero bovino de 3-(1-naftoxi)-2-hidroxi-propilamina y anticuerpos al mismo

El NHPA preparado como se ha descrito en A anteriormente se acopla a albúmina de suero bovino por el siguiente procedimiento. Se mezcla una porción de 83 mg de la hidroxipropilamina con lo siguiente y se deja reposar a temperatura ambiente durante un tiempo de 1,5 a 2 horas aproximadamente: 3 ml de metanol, 0,2 ml de trietilamina y 188 mg de dihidrocloruro de dimetiladipimidato.

El metanol disolvente se retira en vacío y el residuo se disuelve en 1 ml de metanol nuevo. Se añaden gota a gota 60 microlitros de esta solución a una solución agitada conteniendo 100 mg de albúmina de suero bovino (Miles Laboratories, Elkhart, Indiana) en 3 ml de tampón de pirofosfato sódico 0,2M, p.H 8,5. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante la noche y se cromatografía en una columna de 2,5 x 55 cm de Sephadex G 25 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrada con fosfato sódico 0,1M, p.H 7. El primer máximo o cresta de material eluido con absorbancia en 280 nm se recoge

y se concentra por diálisis a presión. El espectro de absorción óptica de este material tiene máximos en 279 y 317 nm. Las mediciones de absorbancia indican que aproximadamente 4 moles de NHPA se ligan por mol de soporte proteínico, es decir,

5

Los anticuerpos contra el inmunógeno se obtienen mezclando entre sí aproximadamente un miligramo del inmunógeno de albúmina de suero bovino NHPA preparado como se ha descrito en B anteriormente en 0,5 ml de tampón de fosfato sódico 0,1 M, p.H. 7, y 0,5 ml de adyuvante de Freund's e inyectando la mezcla subcutáneamente en un conejo. A intervalos de cuatro semanas se administran inmunizaciones de refuerzo. Una vez alcanzado un título de anticuerpo óptimo, se sangra el conejo para dar un volumen adecuado de antisuero específico al inmunógeno administrado.

10

15

C Preparación de conjugado marcado (β -galactosil-umbeliferrona-NHPA)

Una solución de 737 mg (2 mmoles) de ácido 7- β -galactosilcumarin-3-carboxílico y 202 mg (2 mmoles) de trietilamina en 20 ml de DMF seca, se enfría a -10°C mientras se agita a una atmósfera inerte. Se añaden entonces, de una sola vez, 273 mg (2 mmoles) de cloroformato de isobutilo. Después de agitar durante 20 minutos a -10°C , se forma un precipitado blanco de hidrocloreuro de trietilamina, indicando la conversión del ácido al anhídrido mixto. Se combina con 631 mg (3 mmoles) de la hidroxipropilamina preparada como se ha descrito en A anteriormente, se agita una hora a -10°C , se deja entonces calentar a temperatura ambiente y se agita durante 1 hora más. La mezcla de reacción se diluye con 20 ml de DMF y se añaden 8 g de gel de sílice. El disolvente se retira bajo al

20

25

30

to vacío y el gel de sílice impregnado se coloca en la parte superior de una columna de 200 g de gel de sílice constituida en acetato de etilo. La columna se eluye con un gradiente de 1 litro de acetato de etilo a 1 litro de etanol y se recogen 5 fracciones de 10 ml. Las fracciones 109 a 135 se combinan y evaporan. El residuo se recristaliza en metanol para dar 450 mg (rendimiento 39%) del conjugado marcado deseado designado como β GU-NHPA, cristales de color canela, p.f. 200-210°C (reblandecimiento gradual).

10 La eficacia del inmunógeno de albúmina de suero bovino de 3-(1-naftoxi)-2-hidroxipropilamina preparado como se ha descrito en B anteriormente, a la hora de producir anticuerpos, que son específicos a propranolol, se determina por el siguiente procedimiento.

15 Titulación de anticuerpos a NHPA

Se llevan a cabo reacciones de ligación de anticuerpos en 3,05 ml de tampón de N,N-bis-(2-hidroxietil)-glicina 0,05 M, suministrado comercialmente por Calbiochem-Behring, LaJolla, California, bajo la designación registrada Bicine, 20 pH 8,5, conteniendo 0,016 % v/v de un detergente, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán, disponible en el comercio a partir de J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, con la designación registrada Tween 20, y el conjugado marcado preparado como se ha descrito en C anteriormente a un nivel que proporciona una absorbancia de 0,00023 a 340 nm. Se añaden varios volúmenes de antisuero obtenido como se ha descrito en B anteriormente, a mezclas de reacción adecuadas y luego se añaden 0,05 ml de β -galactosidasa, 0,5 unidades por ml, a cada una de las mezclas de reacción. Una unidad de β -galactosidasa hidroliza un 25 micromol de β -D-galactosil-orto-microfenol por minuto a 25°C.

30

Las reacciones se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se registra la fluorescencia utilizando luz de 400 nm para la excitación y de 450 nm para la emisión. Durante el procedimiento se efectúan controles con todos los reactivos excepto con β -galactosidasa, para proporcionar los valores de fluorescencia de base que son sustraídos de la fluorescencia medida para las reacciones. Los resultados se ofrecen en la siguiente Tabla I.

TABLA I

<u>Antisuero μl</u>	<u>Fluorescencia neta</u>
0	80
2	46
5	20
10	8
20	3

El conjugado marcado, es decir, β GU-NHFA, se disocia por el encima β -galactosidasa para liberar un producto fluorescente. Cuando se liga por anticuerpo a la hidroxipropilamina, el conjugado se hace inactivo como sustrato para el enzima.

Por tanto, una disminución en el nivel de fluorescencia a medida que aumenta el nivel de antisuero (anticuerpos), indica que los anticuerpos producidos por el inmunógeno se ligan al conjugado marcado.

La relación anticuerpo-fluorescencia mostrada en la Tabla I anterior se emplea para establecer un inmunoanálisis fluorescente marcado con sustrato (SLFIA) para propanolol, como más abajo se describe.

SLFIA

El SLFIA está basado en la ligación competitiva de anticuerpos a propanolol y conjugado marcado, β GU-hidroxipropilamina, es decir, β GU-NHFA. Se preparan los siguientes reactivos.

Reactivo anticuerpo/enzima

Se establecen reacciones de ligación competitiva (tales como 1 ml) en una serie de cubetas conteniendo 50 mM de tampón glicina, pH 8,5, 0,016 % de monooleato detergente, 5
varios niveles de propranolol y N-3-(1-naftoxi)-2-hidroxi-propil-7- β -galactosil-cumarin-3-carboxamida, a un nivel que proporcione una absorbancia de 0,00023 a 340 nm. A cada cubeta se añaden luego 10 microlitros de antisuero y se mezcla el contenido. Se añade una porción de 50 ml de β -galactosidasa (0,5 unidades/ml) y las reacciones se incuban a temperatura ambiente durante 10
30 minutos. 30 minutos después de la adición del enzima a cada cubeta, se registra la fluorescencia. Se establecen también controles pero sin el enzima; la fluorescencia medida para los controles se sustrae de los valores para la correspondiente reacción enzimática. 15

Se obtienen los siguientes resultados de análisis mostrados a continuación en la Tabla II.

TABLA II

<u>Prop anolol en análisis (nM)</u>	<u>Fluorescencia neta</u>
0	9
32	12
158	28
604	49

El método de análisis de ligación competitiva utiliza la cantidad de ligación entre propranolol y anticuerpo (Ab) 25
(para formar el conjugado Ab-propranolol) y la cantidad de ligación entre β GU-NHPA y Ab (para formar el conjugado Ab- β GU-NHPA). Si la cantidad de propranolol presente se puede emplear para determinar la cantidad de alivio de inhibición de fluorescencia, 30
el sistema de análisis es suficientemente sensible para medir la cantidad de propranolol presente en una muestra. Como se ilustra

en la Tabla 2, a medida que aumenta la cantidad de propanolol, se alivia la inhibición de fluorescencia por el antisuero presente y aumenta la cantidad de fluorescencia. De este modo, se proporciona un análisis para determinar la cantidad de propanolol presente en una muestra, utilizando los reactivos de la presente invención.

EJEMPLO 2

A. Preparación de ácido 3-N- $\sqrt{2}$ -hidroxi-3-(1-naftoxi)-1-propil/aminobutírico (NHAB)

Se agita a la temperatura de reflujo, bajo una atmósfera de árgon, durante 2 días, una mezcla de 2,61 g (11 mmoles) de la clorhidrina preparada como en el ejemplo 1, A, 1,10 g (11 mmoles) de ácido 3-aminobutírico suministrado por Aldrich Chemical Co. Milwaukee, Wisconsin, USA y 1,85 g (22 moles) de bicarbonato sódico en 50 ml de etanol absoluto. A la mezcla de reacción se añade gel de sílice 60, suministrado por E. Merck AG, Darmstadt, RFA, 20 g, y el disolvente se evapora bajo alto vacío. El gel de sílice impregnado se coloca en la parte superior de una columna de 300 g de gel de sílice 60 preparado en etanol al 95 %. La cromatografía se desarrolla con 95 % de etanol y se recogen fracciones de 20 ml. Las fracciones 280 y 425 se combinan y se evaporan para dar un aceite de color amarillo pálido. El aceite se disuelve en una pequeña cantidad de metanol y se deja reposar durante una semana a temperatura ambiente. El producto NHAB cristaliza en la solución y se recoge por filtración para dar 525 mg (15,7 % de rendimiento) de un sólido blanco que funde a 196°C.

Análisis: Calculado para: $C_{17}H_{21}NO_4$: C, 67,31;
H, 6,98; N, 4,62.

Encontrado: C, 66,88; H, 6,86; N, 4,61

Espectro IR (KCl): 1600 cm^{-1} (C=O);
1580 cm^{-1} (C=O).

B. Preparación de inmunógeno de albúmina de suero bovino de ácido 3-N- $\sqrt{2}$ -hidroxi-3-(naftoxi)-1-propil/aminobutírico

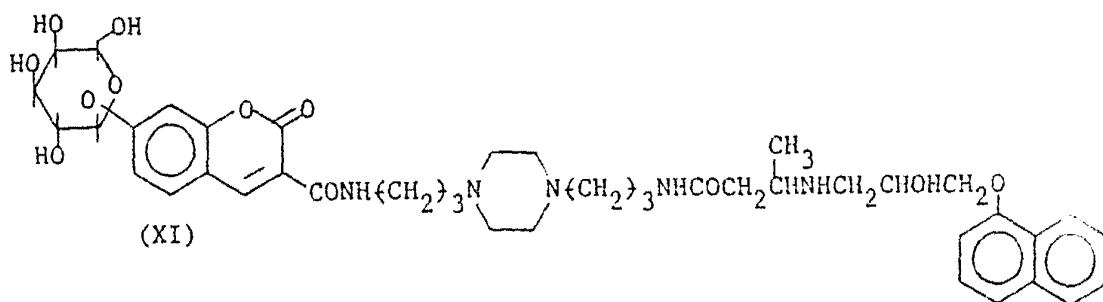
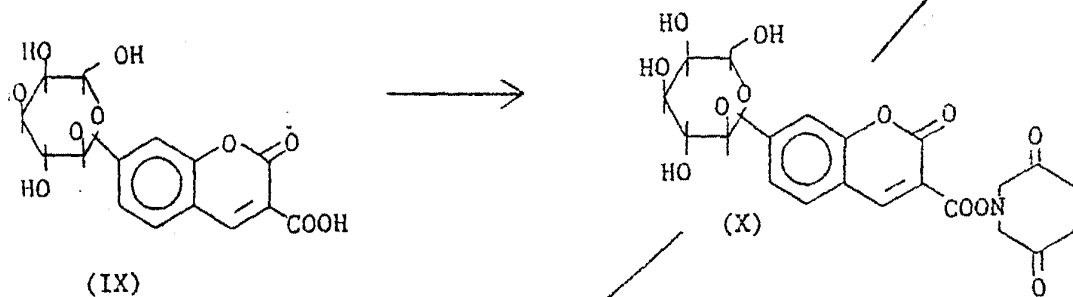
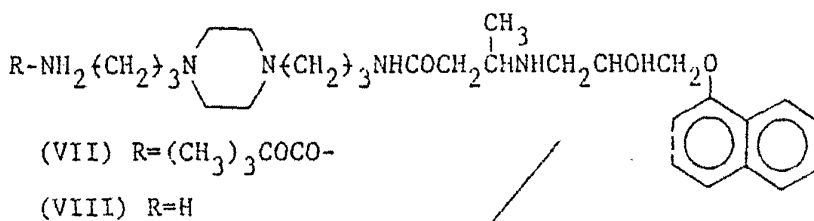
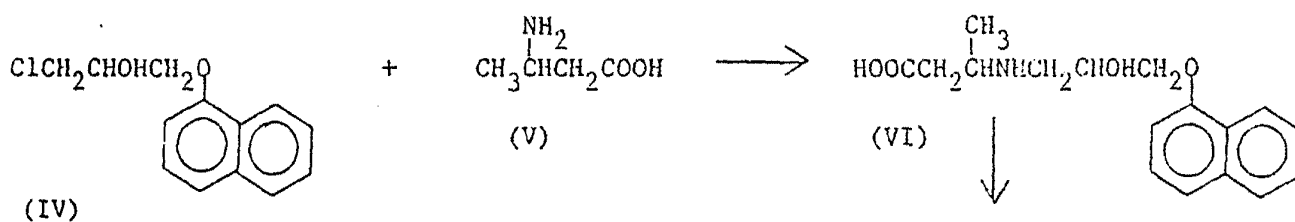
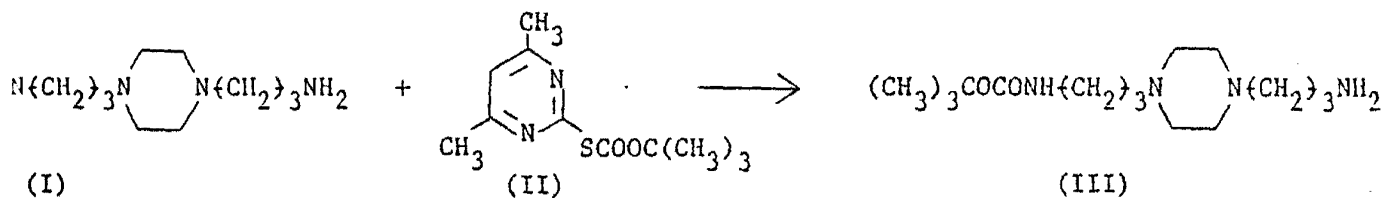
5 El producto NHAB preparado como en A anteriormente se acopla a albúmina de suero bovino metilada por el siguiente procedimiento (véase C. Bohoun, et al., Clin. Chim. Acta, 57, 263 (1974). A 2 ml de una solución acuosa de 90 mg de albúmina de suero bovino metilada (pH 5,5; 4°C) [véase J. D. Mandell y A. D. Hershey, Anal. Biochem, 1:66 (1960)] se añade una lechada de 50 mg de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbo-
10 diimida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) como una lechada en una solución de 15 mg del derivado de ácido carboxílico en 0,2 ml de DMF. El pH final se ajusta a 5,5 y la reacción se agita durante la noche en la oscuridad a 4°C. El conjugado de NHAB-inmunógeno resultante se puede purificar por cromatografía
15 sobre Sephadex G-25 como anteriormente se ha descrito para el conjugado NHPA-inmunógeno.

Los anticuerpos contra el inmunógeno pueden ser elevados como anteriormente se ha descrito para el conjugado NHPA-inmunógeno, Ejemplo 1, B.

20 Opcionalmente, y como más abajo se describe, se pueden emplear anticuerpos contra el inmunógeno del ejemplo 1.

C. Preparado del conjugado marcado (β -galactosil-umbeliferona-NHAB)

25 El conjugado marcado se prepara de acuerdo con el siguiente esquema, como a continuación se describe.



La columna se eluye con un gradiente lineal de 2 litros de etanol al 95 % a 2 litros de etanol/bicarbonato de trietilamonio acuoso 1 M 7:3 (v/v) y se recogen fracciones de 20 mL. Las fracciones 65 a 80 se recogen y evaporan para dar 650 mg (rendimiento 37%) de la piperazina (VII) como un aceite claro.

1- β -(7- β -galactosilcumarin-3-carboxamido)propil-4-[[[3-[[3-
N-(1-naftoxi-2-hidroxi-3-propil)amino]butiramido]]propil]]]piperazina XI

El derivado terc-butoxicarbonilamino (VII) (645 mg, 1,1 mmol) se coloca en un matr az de 50 ml en forma de pera y se enfria a -9 C bajo una atmósfera inerte. Se añaden 20 ml de ácido trifluoracético anhidro y la mezcla se agita a esta temperatura durante 3 horas. Al final de este tiempo, la solución se evapora a 0 C en un evaporador rotativo unido a una bomba de vacío. Queda así la sal de ácido trifluoracético de la amina (VIII) como un aceite de color rojo claro que no es caracterizado. Se recibe en 25 ml de agua y se ajusta el pH de la solución a 8 con solución de hidróxido sódico.

Se prepara una segunda solución disolviendo 410 mg (1,1 mmoles) de ácido 7- β -galactosilcumarin-3-carboxílico (IX) [J. F. Burd, et. al., Clin. Chem., 23(8): 1402 (1977)] y 250 mg (2,2 mmoles) de N-hidroxisuccinimida en 15 ml de DMF seca. La solución se enfria a -10 C y se añaden 252 mg (1,2 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida. Se retira el baño de enfriamiento y se deja calentar el contenido del matr az a temperatura ambiente y se agita durante un total de 3 horas.

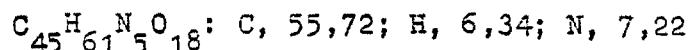
La solución acuosa de amina (VIII) (pH 8,0) se enfria a 0 C y la solución en DMF, conteniendo ahora al éster activado (X), se añade gota a gota a la misma durante 10 minutos. El pH se ajusta entonces a 7 con solución de hidróxido sódico y se conti-

5 nua la agitación durante la noche a temperatura ambiente. Se añaden 15 g de ácido silícico y el disolvente se retira bajo presión reducida. El adsorbente impregnado se coloca en la parte superior de una columna de 100 g de ácido silícico constituida en etanol al 95 %. La columna se lava con 500 ml de este disolvente, se eluye luego con un gradiente lineal de 2 litros de etanol al 95 % a 2 litros de etanol al 95 %/dicarbonato de trietilamonio acuoso 1M 4:1 (v/v). Se recogen fracciones de 15 ml.

10 Las fracciones 35 a 60 se recogen y se evaporan para dar 420 mg del conjugado XI como un cristal de color canela pálido. Se recibe en 5 ml de metanol y se aplica a una columna de Sephadex LH-20 (90 cm x 2,5 cm) equilibrada en metanol. La elución es con metanol (velocidad de flujo 1,3 ml/minuto) mientras se recogen fracciones de 10 ml.

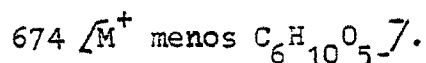
15 Las fracciones 30 a 39 se combinan, se evaporan y se secan bajo alto vacío para dar 200 mg (rendimiento 19%) de conjugado (XI) como un cristal de color canela pálido.

Análisis: Calculado para la sal bis-carbonato



20 Encontrado: C, 54,98; H, 6,13; N, 7,00.

Espectro de masa (desorción de campo): m/e 836 $[M^+]$;



Rotación óptica: $D = -32,62^\circ$ (c 1,0, CH₃OH).

Titulación de anticuerpo con XI

25 Se titula con XI el antisuero al conjugado de albúmina de suero bovino 3-(1-naftoxi)-2-hidroxipropilamina. Se utiliza una serie de cubetas con 3 ml de 50 mM de tampón glicina, pH 8,5, y 0-15 microlitros de antisuero. A cada cubeta se añaden 100 microlitros de XI (absorbancia en 340 nm: 0,011) en tampón
30 glicina con 0,003 % del detergente monooleato y se mezcla el con-

tenido. Se añaden 100 microlitros de β -galactosidasa (0,005 unidades/ml) y las reacciones se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos. Al final del periodo de incubación, se registra la fluorescencia utilizando luz de 400 nm para la excitación y de 450 nm para la emisión.

<u>Antisuero (μl)</u>	<u>Fluorescencia neta</u>
0	89
3	67
6	48
9	37
12	34
15	33

Estos resultados demuestran que la fluorescencia disminuye a medida que aumenta el nivel de antisuero.

Análisis de ligación competitiva empleando XI

Se preparan los siguientes reactivos: reactivo fluorogénico - XI (absorbancia en 340 nm de 0,011) en tampón de 5 mM formato sódico-ácido fórmico, pH 4,5, conteniendo 0,003 % de Tween 20. Reactivo de anticuerpo/enzima: β -galactosidasa (0,005 unidades/ml) y 10,8 microlitros de antisuero/ml de tampón glicina 50 mM pH 8,5. Calibrador de propanolol: un microgramo de propanolol por ml de tampón glicina 50 mM, pH 8,5.

Método de análisis

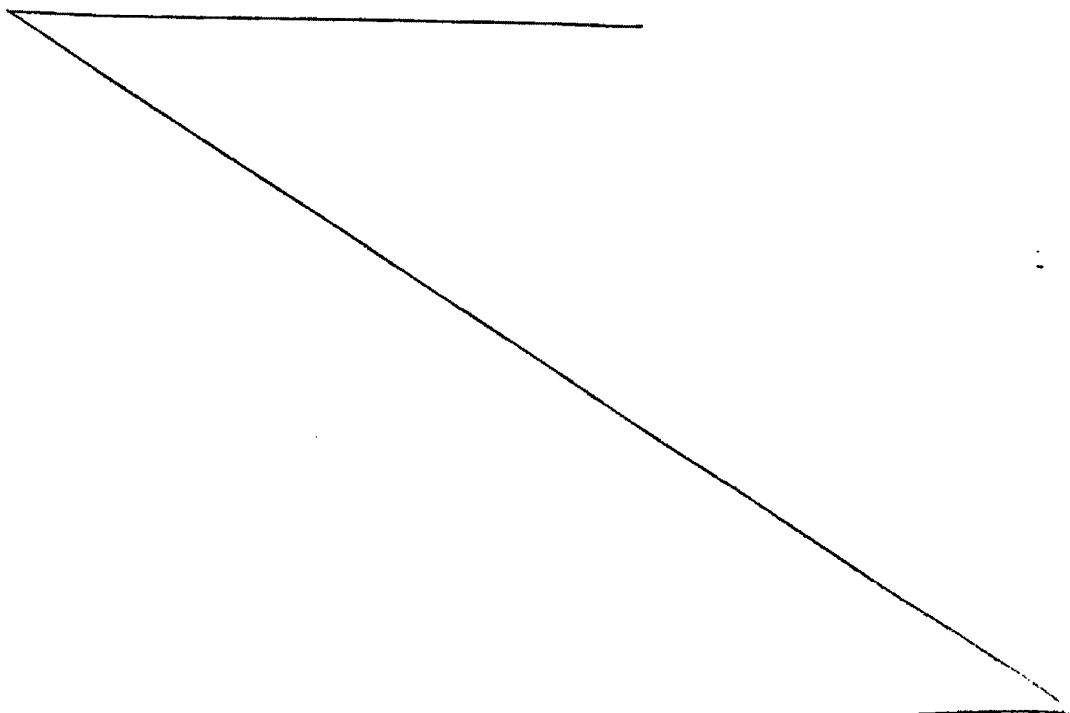
Se añaden partes alicuotas de 0 a 100 microlitros del calibrador de propanolol a una serie de cubetas conteniendo 3 ml de tampón glicina 50 mM, pH 8,5. A cada cubeta se añade 100 microlitros del reactivo anticuerpo/enzima y se mezcla el contenido. Entonces se añaden 100 microlitros del reactivo fluorogénico y se dejan reposar las reacciones a temperatura ambiente durante 20 minutos. Al final de este periodo de incubación, se

registra la fluorescencia.

	<u>Propranolol ng/análisis</u>	<u>Fluorescencia neta</u>
	0	35
	5	40
5	10	45
	20	52
	40	63
	80	70
	100	70

10 A medida que aumenta el nivel de propranolol, lo hace también la fluorescencia, indicando que la droga y el compuesto azo compite con respecto a los puntos de ligación de anticuerpo.

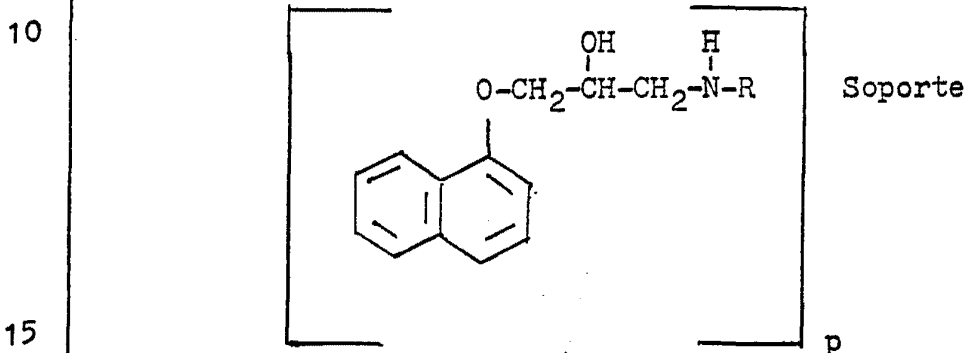
15 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de inmuncanálisis para determinar propranolol en una muestra de análisis, caracterizado porque comprende las etapas de:

5 (a) formar una mezcla de reacción, que tiene un pH de 5-10 aproximadamente, y que incluye una forma marcada de propranolol que proporciona una señal óptica detectable, y un anticuerpo a propranolol dirigido contra un conjugado inmunógeno de fórmula:

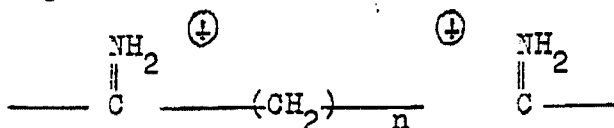


en donde R es un grupo de enlace, el soporte es un material soporte inmunógeno y p es en promedio de 1 a 50, aproximadamente;

20 (b) incubar la mezcla de reacción entre 15 segundos y 2 horas aproximadamente, a una temperatura de 5 a 50°C aproximadamente; y

(c) medir la señal óptica detectable producida por la mezcla de reacción como una función de la concentración de propranolol en la muestra de análisis.

25 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque R es un bis-inidato de fórmula:



30 en donde n es de 2 a 10 y dicho soporte está acoplado a través

