



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 297 955**

⑫ Número de solicitud: 200302737

⑬ Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **21.11.2003**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2008**

Fecha de la concesión: **24.02.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

⑲ Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑳ Inventor/es: **Pérez-Inestrosa Villatoro, Ezequiel;**
Suau Suárez, Rafael;
Blanca Gómez, Miguel;
Montáñez Vega, María Isabel;
Mayorga Mayorga, Cristobalina y
Torres Jaén, María José

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Complejos multivalentes hapteno-portador con dendrímeros como emuladores de la proteína portadora.**

㉓ Resumen:

Complejos multivalentes hapteno-portador con dendrímeros como emuladores de la proteína portadora.

La presente invención trata de la producción de complejos multivalentes hapteno-portador, en los que la proteína portadora está emulada por un dendrímero o molécula dendrímica, que actúa como macromolécula portadora sobre la que se une de forma covalente el hapteno único o combinado de diferentes fármacos o estructuras químicas. Estos complejos multivalentes hapteno-portador se pueden utilizar, acoplados a fases sólidas o en fase soluble, como estructuras antigénicas para la captación de anticuerpos IgE específicos de antibióticos beta-lactámicos y de otros fármacos, permitiendo su aplicación en técnicas diagnósticas *in vitro* que evalúen las reacciones alérgicas, siendo asimismo aplicables en sistemas de análisis tipo inmunoensayo.

ES 2 297 955 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Complejos multivalentes hapteno-portador con dendrímeros como emuladores de la proteína portadora.

La presente invención se refiere a la utilización de dendrímeros funcionalizados en su superficie con medicamentos, para emular *in vitro* a los conjugados hapteno-portador generados *in vivo*, responsables de los procesos de reconocimiento de anticuerpos IgE dirigidos a estos fármacos. La exactitud de la estructura química del conjugado hapteno-dendrímero, en cuanto al número de haptenos anclados en su superficie y la disposición tridimensional, mejoran la calidad de la técnica para la detección de anticuerpos IgE con respecto al empleo de otras macromoléculas tradicionalmente empleadas.

Antecedentes

Para la detección *in vitro* de anticuerpos IgE dirigidos a medicamentos se usan conjugados Hapteno-Portador (en adelante H-P) sintéticos en los que la proteína portadora es emulada por Albúmina Humana (en adelante HSA) o poli-L-lisina (en adelante PLL). Estos conjugados adolecen de dos factores imprescindibles para que el proceso de reconocimiento molecular sea reproducible y sensible: no presentan una densidad de Hapteno por unidad de portador precisa en sus estructuras y, además, las moléculas de Hapteno se encuentran distribuidas de forma aleatoria en la amplia superficie de la proteína o el polipéptido, lo que entraña la eventual inaccesibilidad de los anticuerpos específicos. La HSA presenta la limitación intrínseca de poder soportar una densidad de H-P baja, además de la dificultad de poder establecer la estructura exacta de estos conjugados. Por otro lado, los conjugados con PLL, aunque con una mayor densidad H-P, actualmente consisten en una mezcla de estructuras químicas de diferentes tamaños, ya que la PLL comercial es siempre una mezcla heterogénea de péptidos de un determinado rango de pesos moleculares. Como consecuencia, estos conjugados se caracterizan por una baja reproducibilidad estructural y consecuentemente una baja fiabilidad.

Explicación de la invención

La presente invención trata de la producción de complejos multivalentes H-P, en los que la proteína portadora está emulada por un dendrímero o molécula dendrímica, que actúa como macromolécula portadora sobre la que se une de forma covalente el hapteno único o combinado de diferentes fármacos o estructuras químicas.

Estos conjugados H-P, preparados utilizando dendrímeros para simular la proteína portadora (en adelante H-D), son estructuras macromoleculares de composición química perfectamente definidas. El empleo de dendrímeros de diferentes generaciones permite obtener conjugados H-D con diferentes, pero precisos, números de Haptenos unidos por enlaces de tipo covalente a la superficie del dendrímero. El empleo de las técnicas convencionales de determinación estructural, como la Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono trece, la Espectrometría de Masas de tiempo de vuelo con ionización por láser asistida por matriz, la espectroscopia de fotoelectrones de rayos-X y otras, permiten analizar y establecer de forma unívoca las estructuras de estos conjugados H-D.

Los conjugados H-D se pueden utilizar, acoplados a fases sólidas o en fase soluble, como estructuras antigénicas para la captación de anticuerpos IgE específicos de antibióticos beta-lactámicos y de otros fármacos, permitiendo su aplicación en técnicas diagnósticas *in vitro* que evalúen las reacciones alérgicas, siendo asimismo aplicables en sistemas de análisis tipo inmunoensayo.

Para la realización de las determinaciones de inmunoensayos en los que el conjugado H-D se encuentre en fase soluble, al dendrímero, de la generación elegida, se le une de forma covalente el medicamento, empleando los reactivos de acoplamiento adecuados en cada caso y se puede purificar empleando las técnicas de cromatografía convencionales.

Para la realización de las determinaciones de inmunoensayos en los que el conjugado H-D se encuentre acoplado a fases sólidas, las superficies de las fases sólidas, como celulosa, sílice o cualquier otro análogo, se activan con los reactivos adecuados, como bromuro de cianógeno, alfa-halocloruros de ácidos o agentes de acoplamiento similares, para enlazar los dendrímeros, se tratan con amino-alcoholes para neutralizar los grupos activados libres y se funcionalizan con el hapteno capaz de ser reconocido por las IgE's.

Descripción de un modo de realización

A continuación se presenta un modo de realización preferida para la obtención de estos conjugados H-D.

Discos de celulosa se activan, por ejemplo, con bromuro de cianógeno para transformar los grupos hidroxilos en los derivados cianatos. Después del tiempo de reacción, los discos se lavan con bicarbonato sódico 0.1 M y con concentraciones crecientes de acetona, y se hacen reaccionar con los grupos amino-terminales del dendrímero, para dar las isoureas derivadas a través de las cuales el dendrímero se ancla sobre la fase sólida. Las fases sólidas se filtran, se lavan con disolución de bicarbonato sódico 0.1 M y se hacen reaccionar con etanolamina durante 1 hora, para desactivar los grupos isocianatos que permanezcan libres. Una posterior filtración y lavado (secuencia) con una disolución de bicarbonato sódico 0.1 M, una disolución tampón ácido acético-acetato sódico 0.1 M de pH 4 y finalmente una disolución carbonato sódico-bicarbonato sódico 0.05 M de pH 10.2, nos permite obtener una superficie modificada químicamente, en la que la unión covalente de los dendrímeros a esta fase sólida puede utilizarse para inmovilizar de forma covalente una variedad de analitos de significación clínica.

ES 2 297 955 B1

Como ejemplo, esta fase sólida sobre la que hemos fijado el dendrímero, se suspende en un tampón carbonato
sódico-bicarbonato sódico 0.05 M de pH 10.2 y se hace reaccionar con bencilpenicilina (Penicilina G) durante 48
horas a 4°C, se filtra pasado este tiempo y se lava con una disolución de bicarbonato sódico 0.1 M. De esta forma,
se obtiene una fase sólida sobre la que se encuentra fijado de forma covalente, un conjugado H-D peniciloilado en su
superficie, que contiene el determinante antigénico mayor (BPO) de los anticuerpos IgE dirigidos a bencilpenicilina.
Los discos que contienen el conjugado H-D con antígenos BPO, se guardan en disolución tampón PBS a 4°C.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1 . Complejos multivalentes hapteno-portador, **caracterizados** porque la proteína portadora está emulada por un
5 dende mero o molécula dendrímica, que actúa como macromolécula portadora sobre la que se une de forma covalente
el hapteno único o combinado de diferentes fármacos o estructuras químicas.

2. Utilización de los complejos multivalentes hapteno-portador de reivindicación 1 en análisis de tipo inmunoen-
sayo para la determinación de anticuerpos IgE específicos.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 297 955

⑫ Nº de solicitud: 200302737

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.11.2003

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 33/543** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20030119208 A1 (BLAKELY SOKOLOFF TAYLOR & ZAFMAN) 26.06.2003 página 1, párrafo [0010] - página 2, párrafo [0019]; reivindicaciones 1,4.	1-2
X	SANCHEZ-SANCHO F., PEREZ-INESTROSA E., SUAU R., MAYORGA C., TORRES M.J., BLANCA M., "Dendrimers as carrier protein mimetics for IgE Antibody recognition. Synthesis and characterization of densely penicilloylated dendrimers" Bioconjugate Chem. 2002 vol. 13 páginas 647-653.	1-2
A	WO 9527902 A1 (DADE INTERNATIONAL INC.) 19.10.1995, página 6, líneas 11-28.	1-2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la
misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación
de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha
de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.04.2008

Examinador

M. Cortés Duro

Página

1/1