

COMPUESTOS INMUNORREACTIVOS, ANTICUERPOS ANTI-DAPTOMICINA, BIOSENSORES OBTENIDOS A PARTIR DE ESTOS Y MÉTODOS PARA SU OBTENCIÓN

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto resultante de la unión de un antibiótico y una proteína para monitoreo terapéutico de medicamentos antibióticos, más particularmente para detectar y cuantificar la presencia de antibióticos daptomicina, aún más particularmente, para detectar y cuantificar la presencia de antibióticos en tejidos y fluidos de pacientes animales que han sido tratados con estos antibióticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El aumento de las bacterias multirresistentes, que se cree que se debe principalmente a la prescripción excesiva de antibióticos en humanos y, especialmente, al uso excesivo en animales domésticos (incluida la prescripción profiláctica), pone de manifiesto la necesidad de moderar el uso de tratamientos de último recurso. Un informe reciente de la Agencia Europea de Medicamentos (2013) recomienda una terapia antimicrobiana racional que incluya el cese de su uso en el control y tratamiento de *Salmonella* spp. en aves de corral y cerdos, y en la mejora de la producción, por ejemplo, el aumento de la eficiencia alimentaria o la promoción del crecimiento. Además, la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (2002) y la Comisión del Codex *Alimentarius* han establecido el límite máximo de residuos de antibióticos.

Más del 70% de las bacterias son resistentes a todos o casi todos los antimicrobianos conocidos, lo que crea la necesidad de desarrollar nuevos tipos de antimicrobianos o el uso de terapias antimicrobianas de "última línea" para el tratamiento de bacterias multirresistentes. Debido a la toxicidad de este tipo de moléculas, es necesario desarrollar nuevas metodologías rápidas para ser utilizadas en la Monitorización Terapéutica de Fármacos (TDM, por sus siglas en inglés). La TDM podría mejorar los resultados de los pacientes y reducir los costos de atención médica al permitir un resultado clínico favorable. Para este seguimiento se utilizan diversas técnicas, como

la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y los inmunoensayos. El objetivo de esta solicitud es el desarrollo y caracterización de compuestos específicos para el reconocimiento de los antibióticos, para el seguimiento de estos antibióticos en diferentes tejidos o fluidos animales, como el plasma humano. Estos compuestos ofrecen una herramienta prometedora para el seguimiento terapéutico preciso y eficaz de estos antibióticos críticos, lo que podría mejorar la eficacia del tratamiento y la seguridad del paciente.

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se ha convertido en los últimos años en uno de los principales problemas de salud pública, debido al uso inadecuado y excesivo de agentes antibióticos tanto en el ámbito clínico como en el veterinario, lo que ha provocado un aumento de las mutaciones genéticas de las bacterias y su transferencia horizontal. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en 2050, las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos podrían causar la muerte de 10 millones de personas en todo el mundo cada año a un costo de alrededor de USD 100 billones en pérdidas para la producción de nuevas moléculas. Esto ha llevado a la necesidad de implementar una serie de medidas para minimizar el impacto, como prescribir y dispensar antibióticos solo cuando sea necesario o evitar infecciones mediante la capacitación y garantizar la limpieza de manos, instrumental y medio ambiente. Sin embargo, las medidas para reducir el aumento de las infecciones por RAM no han sido suficientes. Por el contrario, ha ido en aumento, afectando no solo la salud de los pacientes sino también la estabilidad financiera de los sistemas de salud a nivel mundial [7]. Este aumento de las bacterias de la resistencia a los antimicrobianos ha requerido el desarrollo de nuevos tipos de antibióticos o el uso de terapias antibióticas con fármacos de "última línea" altamente tóxicos como la colistina.

Debido a lo anterior, se hizo necesario el monitoreo terapéutico de fármacos (TDM), una herramienta de importancia clínica definida como la individualización de la dosis de un fármaco, manteniendo las concentraciones del fármaco en órganos o fluidos corporales (sangre, plasma, orina, entre otros) dentro de un rango objetivo. Este seguimiento se lleva a cabo mediante diferentes técnicas, entre las que se incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS/MS), (HPLC-UV), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), los inmunoensayos y los biosensores. Los inmunoensayos son uno de los más utilizados y se basan

en la unión antígeno-anticuerpo (inmunocomplejo) para la detección de analitos en diferentes muestras. Los principales inmunoensayos utilizados en TDM son los radioinmunoensayos (RIA), los fluoroinmunoensayos (FPIA) y los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA), a los que se ha permitido la cuantificación de antibióticos, anticancerígenos y fármacos biológicos.

El estado del arte enseña diferentes técnicas para medir y cuantificar la presencia de antibióticos comúnmente utilizados contra bacterias multirresistentes, particularmente en productos para y/o derivados de animales. Wang y colaboradores enseñan un método para detectar colistina en alimento para animales y en alimentos provenientes de animales, como carne, leche o huevos. El método divulgado por Wang y colaboradores comprende formar anticuerpos anti-colistina para emplearlos como detectores en pruebas ELISA y LFIA [Wang et al. Journal of Animal Science and Biotechnology: Rapid one-step enzyme immunoassay and lateral flow immunochromatographic assay for colistin in animal feed and food, 2019]. Por su parte, la patente de Estados Unidos No. US 10,620,225 enseña un método para desarrollar anticuerpos anti-polimixina y su uso para detectar polimixina B y rastros de este antibiótico en muestras provenientes de sujetos que han sido tratados con este tipo de antibiótico. Los anticuerpos son policlonales.

A pesar de lo anterior, persiste en el estado del arte la necesidad de nuevos compuestos que puedan ser utilizados como detectores de diferentes tipos de antibióticos, particularmente compuestos que ofrezcan una mayor sensibilidad para detectar y cuantificar antibióticos contra microorganismos multirresistentes, y que puedan ser utilizados en diferentes métodos de detección, desde la creación de anticuerpos naturales o sintéticos para pruebas tipo ELISA o similares, hasta biosensores y otros métodos analíticos conocidos por el técnico con habilidad en el arte.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta solicitud brinda solución a este problema técnico al desarrollar y caracterizar compuestos inmunorreactivos específicos para el reconocimiento de antibióticos tipo daptomicina, para el seguimiento de estos antibióticos en diferentes muestras, tejidos o fluidos animales, como el

plasma animal, incluido el humano. Estos compuestos ofrecen una herramienta prometedora para el seguimiento terapéutico preciso y eficaz de antibióticos críticos, lo que podría mejorar la eficacia del tratamiento y la seguridad del paciente y/o el ambiente.

La presente invención se refiere a diferentes conformaciones de un compuesto inmunorreactivo de fórmula (I) conformado por un antibiótico de tipo daptomicina y un soporte inmunogénico, donde puede o no haber un agente reticulador entre estos dos elementos. Este compuesto inmunorreactivo genera anticuerpos dirigidos a este tipo de antibiótico.

La presente solicitud también propone un método para preparar el compuesto de fórmula (I), un método para obtener anticuerpos policlonales a partir del compuesto de fórmula (I), un método para medir la concentración de antibióticos daptomicina, presente en fuentes de origen animal, preferiblemente humano, en donde las fuentes pueden ser tejidos o fluidos, preferiblemente fluidos, más preferiblemente plasma y/o sangre.

La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), en la obtención de anticuerpos policlonales específicos para daptomicina y para la fabricación de biosensores electroquímicos y ópticos para detectar daptomicina en tejidos de origen animal, preferiblemente humano.

Por último, la presente invención también comprende kits de partes para detectar y/o cuantificar antibióticos tipo daptomicina, los cuales comprenden un compuesto de fórmula (I) y/o un anticuerpo policlonal obtenido a partir de un compuesto de fórmula (I), contenedores y/o soportes para realizar la medición y/o detección de los antibióticos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

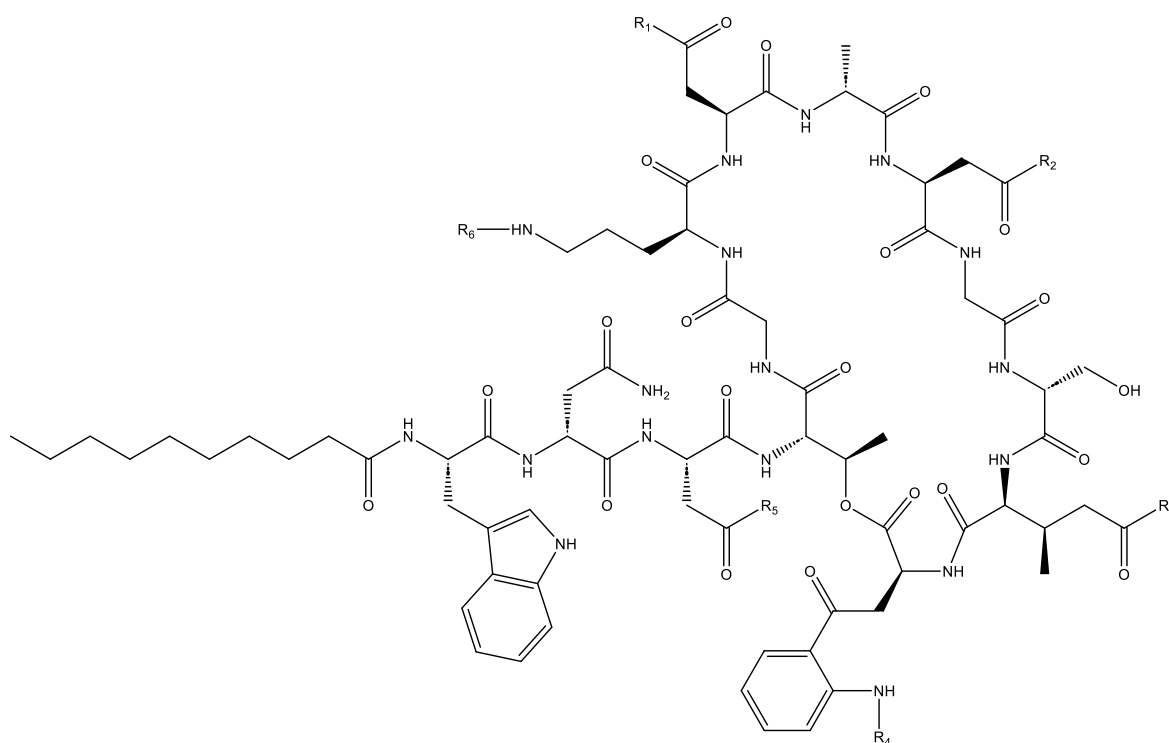
La FIGURA 1 corresponde a la evolución de la titulación de anticuerpos, evaluada mediante un ELISA indirecto no competitivo que realizó varias diluciones de los antiseros.

La FIGURA 2 corresponde a los resultados de la evaluación de las combinaciones óptimas de inmunorreactivos en un ensayo de competencia indirecta por su capacidad para reconocer su antibiótico analito correspondiente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) resultantes de la unión de Daptomicina a soportes inmunogénicos y al uso de estos en la obtención de anticuerpos y/o biosensores con selectividad para antibióticos daptomicina. A su vez se refiere a la utilización de alguno de dichos conjugados, a modo de inmunorreactivos secundarios, y de los anticuerpos generados a partir de ellos, en métodos inmunoquímicos de análisis y biosensores en muestras biológicas.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



(I)

sus sales, isómeros, o solvatos,

donde,

R₁ se selecciona entre OH, OR₇ o NHR₇;

R₂ se selecciona entre OH, OR₇ o NHR₇;

R₃ se selecciona entre OH, OR₇ o NHR₇;

R₄ se selecciona entre H o R₈R₇;

R₅ se selecciona entre OH, OR₇ o NHR₇;

R₆ se selecciona entre H o R₈R₇;

donde R₇ es un soporte inmunogénico que se selecciona entre albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina, peroxidasa de rábano picante (HRP), hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) o hemocianina de cangrejo herradura (HCH);

R₈ es un agente reticulador, en donde el agente reticulador se selecciona entre: dimetil suberimidato dihidrocloruro (DMS·2HCl); C₁₃H₂₆N₂O₄·2HCl, dimetil pimelimidato dihidrocloruro (DMP·2HCl); C₁₂H₂₄N₂O₄·2HCl, o dimetil adipimidato dihidrocloruro (DMA·2HCl);

donde siempre está presente R₇ en una de las posiciones R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆;

donde R₈ está presente junto a R₇ en una de las posiciones R₄ o R₆, pero no en ambas.

Tal como se emplea en la presente invención, “soporte inmunogénico” se refiere a aquellos compuestos con la propiedad de generar una respuesta inmune en un huésped. El soporte idóneo incluye compuestos poliméricos naturales o sintéticos tales como, por ejemplo, pero sin limitarse a, polipéptidos, y oligonucleótidos, preferiblemente proteínas, tales como, por ejemplo, pero sin limitarse a, albúminas, seroproteínas, globulinas, lipoproteínas, hemocianinas. Ejemplos ilustrativos de soporte inmunogénico incluyen seroproteína bovina, ovoalbúmina, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

El término “agente reticulador” se refiere a compuestos que estimulan la estabilidad en la unión del compuesto de fórmula (I) y el soporte inmunogénico. Para el presente caso, se trata de un compuesto bifuncional o multifuncional que puede formar enlaces covalentes entre un hapteno de un compuesto de fórmula (I) y una proteína portadora, o entre una proteína y un soporte sólido.

Por su parte, la expresión “inmunorreactivos secundarios” se refiere a aquellos reactivos necesarios en un inmunoensayo de competencia para la detección de moléculas de bajo peso

molecular. Pueden ser antígenos de tapizado, los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia en formato indirecto y en cuyo caso se unen al soporte sólido y compiten con el analito por el anticuerpo en disolución. Pueden ser trazadores, bien enzimáticos, fluorescentes, los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia en formato directo y en cuyo caso compiten en disolución con el analito por el anticuerpo inmovilizado sobre el soporte sólido.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), y más concretamente, los compuestos específicos pertenecientes a esta fórmula general anteriormente descrita pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de estos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método y uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente, para la obtención de anticuerpos policlonales de amplio espectro contra antibióticos tipo daptomicina.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, un método para la obtención de anticuerpos policlonales contra antibióticos tipo daptomicina comprende los pasos de:

- a) Preparación de una emulsión entre el compuesto de fórmula (I) y un adyuvante apropiado
- b) Inmunización de un animal no humano con la emulsión del compuesto de fórmula (I) preparada en a),
- c) Extracción de los anticuerpos generados en (b).

El soporte inmunogénico puede ser cualquier polímero sintético o natural, oligonucleótido, polipéptido o proteína para conjugación de haptenos conocida en el estado de la técnica, aunque preferiblemente se selecciona entre las proteínas seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenible por el procedimiento según se ha descrito.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los anticuerpos descritos para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo daptomicina, especialmente en una muestra biológica aislada. Preferiblemente, esta muestra biológica es de plasma sanguíneo, más preferiblemente de animales y aún más preferiblemente de humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso como inmunorreactivos secundarios de los compuestos de fórmula (I) descritos, en la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo daptomicina, especialmente en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica es de plasma sanguíneo, más preferiblemente de animales y aún más preferiblemente de humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la detección y/o cuantificación del antibiótico daptomicina que comprende al menos un anticuerpo o un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente.

Los componentes de este kit pueden estar unidos a distintos tipos de soportes conocidos en el estado de la técnica, tales como placas de poliestireno para ensayos ELISA o superficies sensoras de un biosensor. Asimismo, el kit también puede incluir otro tipo de componentes y reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis de la muestra problema.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit de detección descrito anteriormente para la determinación y/o cuantificación de antibióticos tipo daptomicina, especialmente en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de origen humano y más preferiblemente son muestras de plasma sanguíneo. Esta muestra también puede ser no-biológica, por ejemplo, muestra de suelos, residuos, líquidos, plantas, microorganismos, alimentos, materia prima de cualquier origen y cualquier otro tipo de muestra.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se

proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Preparación de los compuestos de fórmula (I)

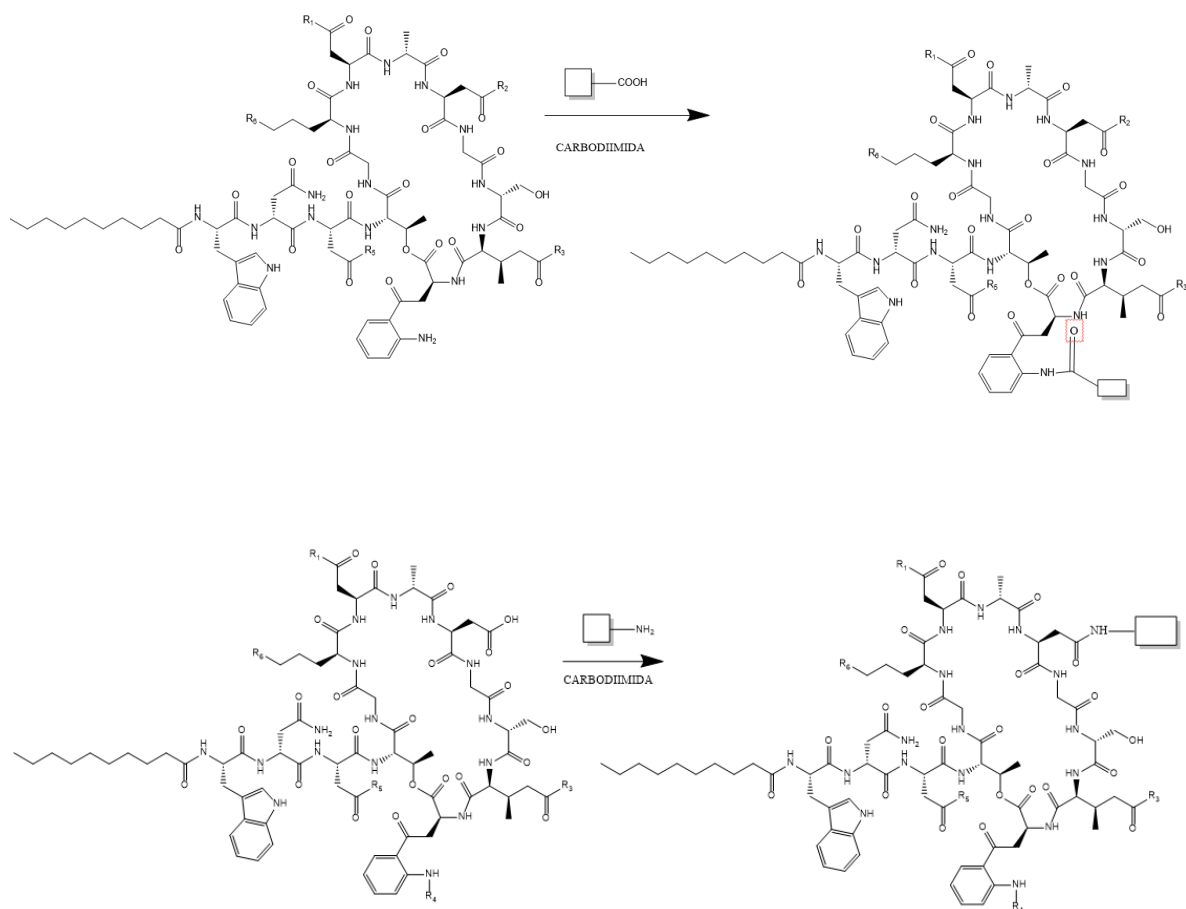
Los compuestos de fórmula (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica e inmunoquímica, en particular por los procedimientos generales que se presentan en los esquemas siguientes. Los materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos descritos en la literatura.

La activación del soporte inmunogénico se puede realizar mediante cualquier técnica bioquímica conocida, aunque en el procedimiento de la presente invención preferiblemente se realiza haciendo reaccionar el soporte inmunogénico con ésteres de succinimida o agentes reticulantes con grupos imidoéster a modo de compuesto de unión bifuncional.

a) Vía éster activo

En el caso de la presencia de grupos amina y carboxílico se conjugan con los soportes inmunogénicos usando la reacción de la carbodiimida o cualquier otro activador de la reactividad de ácidos carboxílicos, bien procedan del antibiótico o del soporte inmunogénico (véase esquema 1).

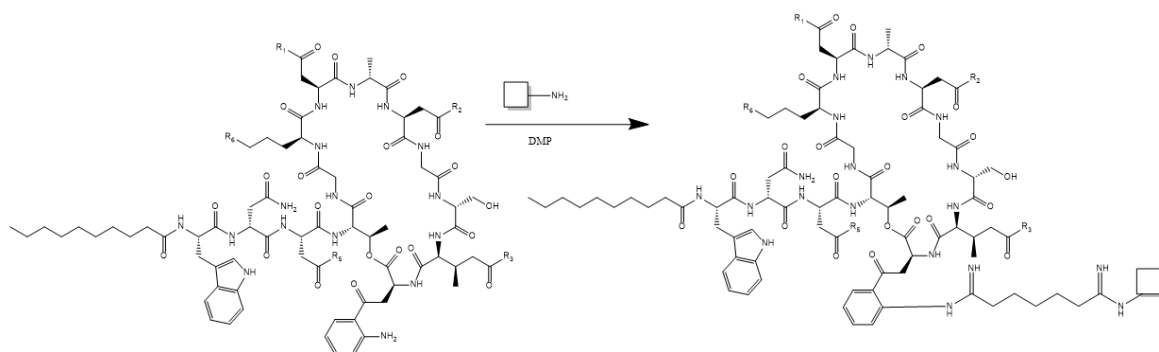
Esquema 1



b) Vía agente reticulador

En una modalidad alternativa, los grupos amina también se conjugan a los soportes inmunogénicos previamente funcionalizados a través de sus grupos amina usando un “*agente reticulador*”. Dichos agentes reticuladores pueden ser cloruro cianúrico, bis-Imidoésteres, bis-Nsuccinimidil, diisocianatos o diisotiocianatos, biacilazidas, 5-dihaldehidos, dicetonas o cualquier compuesto susceptible de reaccionar con varios grupos amina por etapas (véase esquema 2).

Esquema 2



A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de fórmula (I) como inmunorreactivos para la obtención de anticuerpos antidaptomicina y desarrollo de inmunoensayos para la detección de dicho antibiótico.

Ejemplos

Equipos

El MALDI-TOF-MS (espectrómetro de masas con detección por tiempo de vuelo, con ionización por desorción mediante láser asistida por matriz) usado para analizar los conjugados de proteína fue una Estación de Trabajo Perspective BioSpectrometry provista del software Voyager-DE-RP (versión 4.03) desarrollado por Perspective Biosystems Inc. (Framingham, MA) y Grams/386 (para Microsoft Windows, versión 3.04, nivel III) desarrollado por Galactic Industries Corporation (Salem, NH).

Las mediciones amperométricas se realizaron con un equipo portátil Potenciostato μ STAT 200 (Dropsens, España). Electrodo de pantalla impresa de oro (Au/SPEs DRP-220AT, Dropsens, España) compuestos por un electrodo de trabajo de oro liso de 4 mm, un contraelectrodo de platino, un electrodo de referencia de Ag y contactos eléctricos de plata.

Las mediciones ópticas se realizaron con un biosensor OpenPlex. HORIBA Scientific SPR imaging. Francia. Se utilizaron chips de oro SPR sensor chips, 28.0 x 12.5 x 0.3 mm. Horiba OpenPlex and EzPlex compatible. Coating: 2D carboxymethyl dextran Surface. Para el control

de instrumentos y análisis de datos se usó el software OpenPlex, Francia S.A.S. Francia, utilizando SPRI-View y SPRI-Analysis. Las curvas de calibración fueron ajustadas a una ecuación logística de cuatro parámetros usando el software Graph Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) y Origin Lab 8.6 (Origin Lab Corporation).

Análisis de la densidad del hapteno

Las densidades del hapteno de los conjugados de proteína se calcularon mediante MALDI-TOF-MS comparando el peso molecular de las proteínas naturales con el de los conjugados. Los experimentos de MALDI se realizaron mezclando 2 μ L de la matriz recientemente preparada (ácido trans-3,5-10 dimetoxi-4-hidroxicinnámico, 10 mg mL⁻¹ en ACN/H₂O 70:30, TFA al 0,1%) con 2 μ L de una disolución de los conjugados o las proteínas en ACN/H₂O 70:30, TFA al 0.1% (5 mg mL⁻¹). Se calculó la densidad del hapteno según la siguiente ecuación: $[PM(\text{Conjugado}) - PM(\text{Proteína})] / PM(\text{Hapteno})$.

Productos químicos e inmunoquímicos

Se obtuvieron los productos inmunoquímicos de Sigma Chemical Co. (San. Luis, MO).

Tampones

Disolución salina tamponada con fosfato (PBS) es tampón fosfato 0,01 M en una disolución salina al 0,8%, y el pH es 7,5. PBST es PBS con Tween 20 al 0,05%. Tampón borato es ácido bórico/borato de sodio 0,2 5 M pH=8.7. Tampón de tapizado es tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Tampón citrato es una disolución 0,04 M de citrato de sodio, pH 5.5. La disolución del sustrato contiene TMB al 0,01% (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) y H₂O₂ al 0,004% en tampón citrato.

Ejemplo 1. Preparación de compuestos de fórmula (I) por la vía de éster activo

La formación de los compuestos de fórmula (I) uniendo el soporte inmunogénico a través de los grupos carboxilo o amina se realizó de la siguiente manera: Se añadió una disolución del antibiótico (10 μ mol) en PBS (100 μ L) a una disolución de la proteína (10 mg) en agua milliQ (1 mL) seguido por la adición de una disolución de EDC (50 μ mol) en agua (100 μ L) y se agitó la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente. Se purificaron los conjugados de las proteínas

mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 l) y agua milliQ (1 x 5 l) y se liofilizaron, obteniendo un compuesto de fórmula (I) DAP-EDC-BSA.

Para el caso que el soporte inmunogénico se une solo a través de los grupos carboxilo, se disolvió el antibiótico en 100 μ L de DMF y la solución se mezcló con 50 μ mol de NHS y 100 μ mol de DCC. La mezcla se dejó reaccionar bajo agitación magnética durante 3 h a temperatura ambiente, hasta que la solución se volvió turbia debido a la precipitación de la diciclohexilurea. Posteriormente, la solución se centrifugó (10 000 rpm durante 10 min) para eliminar el precipitado, el sobrenadante se agregó a la solución de la proteína (10 mg) en solución tampón bórax/borato (100 μ L). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación magnética durante la noche. Finalmente, la mezcla se purificó por diálisis frente a PBS 0,5mM (4 veces x 5 L) y agua Milli-Q (1 vez x 5 L) y se almacenó liofilizada a -80 °C. Las alícuotas de trabajo se almacenan a 4 °C en PBS 0,01 M a 1 mg/ml, obteniendo un compuesto de fórmula (I) DAP-DCC-BSA.

Ejemplo 2. Preparación de compuestos de fórmula (I) por la vía de agente reticulador

Se prepararon dos soluciones: a) una solución de clorhidrato de dimetilpimelimidato (DMP 2HCl, 0,16 mg) en tampón borato 0,2 M (66 μ L) y b) una solución de Daptomicina (0,33 mg) en agua ultrapura (100 μ L) ambas en baño de hielo. A continuación, se mezclaron ambas disoluciones y dicha mezcla se añadió gota a gota a una solución de Proteína (2 mg) en tampón de bórax/borato 0,2 M (500 μ L) sumergida en hielo, manteniendo en agitación durante 10 min y 60 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo base Tris (20 mM) en tampón de borato 0,2 M (134 μ L).

Se purificó el conjugado de la proteína mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 l) y agua milliQ (1 x 5 l) y se liofilizó. Utilizando dicha metodología se obtiene el siguiente compuesto de fórmula (I) DAP-DMP-BSA.

Ejemplo 3. Preparación de antisueros policlonales

Se llevó a cabo el protocolo de inmunización en hembras de conejos blancos New Zealand que pesaban 1-2 kg, mediante métodos ampliamente conocidos por el técnico medio (Salvador, *Analytical Chemistry*. **2007**, 79, 3734-3740). Los compuestos de fórmula (I) (100 µg) disueltos en PBS (0.5 mL) fueron emulsionados con adyuvante de Freund, completo la primera vez e incompleto el resto, en una relación 1:1. Inmediatamente fueron inyectados de manera intradérmica en diferentes lugares de la espalda del animal huésped (una inyección al mes). Se evaluó la evolución de los títulos del anticuerpo midiendo la unión de las diluciones en serie de los diferentes antiseros en placas recubiertas con el correspondiente inmunoreactivo. Después de observarse un título aceptable de anticuerpos, se desangraron los animales y se recogió la sangre en tubos vacutainer provistos de un gel de separación del suero. Se obtuvieron los antiseros mediante centrifugación y se almacenaron a -80 °C.

Ejemplo 4. Pruebas de detección de daptomicina empleando los anticuerpos policlonales del compuesto de fórmula (I)

Desarrollo de ELISAs competitivos indirectos para daptomicina

La avidéz de los antiseros (EDC) y los bioconjugados heterólogos BSA (HCH) se evaluó mediante ensayos de titulación bidimensionales a partir de los cuales se seleccionaron las concentraciones más adecuadas para la combinación de antisuero/bioconjugado competidor (figura 1). En general, las combinaciones heterólogas obtuvieron mayores absorbancias en comparación con los ensayos homólogos porque las heterólogas demuestran más afinidad con el anticuerpo como se observa en la Figura 1.

Las combinaciones óptimas de inmunorreactivos se evaluaron en un ensayo de competencia indirecta por su capacidad para reconocer su antibiótico analito correspondiente (figura 2, tabla 1). Las placas se recubrieron con la concentración elegida de antígeno y el anticuerpo compite con varias concentraciones del antibiótico en solución. Los resultados de todos los antiseros se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros y los parámetros característicos se determinaron como el valor IC50, que se refiere a la concentración que reduce la señal máxima de la curva en un 50%, dando una estimación indirecta de la afinidad del anticuerpo por el analito.

Más concretamente, las placas se recubrieron con el correspondiente antígeno de tapizado (formato indirecto) o antisuero (formato directo) disuelto en tampón de tapizado (100 μL / pocillo) durante toda la noche a 4°C o 4 horas a temperatura ambiente y se cubrieron con placas adhesivas herméticas. Posteriormente, se lavaron las placas con PBST (cuatro veces, 300 μL / pocillo) y se añadieron los patrones de daptomicina (0.01 nM - 10000 nM, en PBST, 50 30 μL / pocillo) seguidos por el correspondiente antisuero (formato indirecto) o trazador enzimático (formato directo) (50 μL / pocillo) a las placas. Después de 30 min a temperatura ambiente, se lavaron las placas como se ha descrito anteriormente y para el caso del formato indirecto se añadió una disolución de IgG antiIgG de conejo marcada con HRP (1/6000 en PBST) (100 μL / pocillo) y se incubaron durante 30 min más a temperatura ambiente. Se lavaron las placas de nuevo, y para ambos formatos se añadió la disolución del sustrato (100 μL / pocillo).

Se detuvo el desarrollo del color después de 30 min a temperatura ambiente con 4N H_2SO_4 (50 μL / pocillo), y se leyó la absorbancia a 450 nm. Las curvas patrón se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros según la siguiente fórmula: $Y = [(A - B)/1 - (x/C)D] + B$, en la que A es la absorbancia máxima, B es la absorbancia 10 mínima, C es la concentración que produce el 50% de la absorbancia máxima, y D es la tangente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea.

De esta manera se obtuvieron los siguientes ELISAs competitivos para daptomicina:

Antisuero	Abs max	Abs min	IC ₅₀ (nM)	Pendiente	LOD (nM)
Rb154	1,82	0,002	61,75	-0,72	1.568
Rb155	0,90	0,005	22,27	-0,63	0.257
Rb156	1,27	0,05	23,52	-0,79	1.433

Tabla 1: Parámetros de ensayos ELISA competitivo para la detección de daptomicina utilizando inmunorreactivos y anticuerpos desarrollados con los inmunoreactivos descritos en la presente invención.

Ejemplo 5. Desarrollo de un biosensor electroquímico para la medición indirecta de daptomicina

Los electrodos serigrafados de oro (SPE) se limpiaron con acetona, se enjuagaron suavemente con agua y etanol absoluto, y luego se secaron al aire hasta que se eliminó toda la humedad. La

activación de la superficie de oro se logró a través de una monocapa mixta autoensamblada (m-SAM), preparada sumergiendo el área superficial de oro activo de los SPE en una solución de etanol que contenía 2 mM de MUA durante 12 horas en condiciones estáticas. A continuación, las virutas se lavaron suavemente con etanol absoluto, se secaron al aire y se almacenaron hasta su uso.

Para la biofuncionalización de cada SPE con DAP-DCC-BSA, se añadieron al electrodo 200 μ L de solución que contenían DCC/NHS (200 mM en DMF) durante 1 hora en condiciones estáticas, seguidas de 100 μ L de DAP-DCC-BSA (100 μ g/mL en PBS) y se incubaron durante 3 a 4 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los SPEs se enjuagaron con PBS y el ácido carboxílico activado no reaccionado se bloqueó añadiendo una solución de etanolamina (1 M en PBS). Finalmente, los chips SPE biofuncionalizados se lavaron con agua y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Los amperogramas se midieron a un potencial aplicado de -0.10 V vs. el electrodo de referencia de plata durante 60 s. Las señales se adquirieron en la tasa de flujo de 100 μ L/min. La señal registrada fue el valor medio de la corriente obtenida en los últimos 20 s cuando se alcanzó el estado estacionario. La diferencia entre la señal obtenida cuando la solución de sustrato (S) es añadida y la señal registrada con el tampón citrato (C) se consideró la señal específica producida por el antiIgG unido al bioconjugado. Las curvas estándar se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros, siguiendo las guías ICH para metodologías analíticas.

De esta manera se obtuvieron las siguientes mediciones para daptomicina:

Antibiótico	Imin	Imax	Pendiente	IC ₅₀ suero diluido(nM)	IC ₅₀ real (nM)	LOD suero diluido (nM)	LOD real (nM)
DAP	0.336	0.448	-1.87	3.15	31.52	0.26	26

Tabla 2: Parámetros de los ensayos con biosensor electroquímico para la detección de daptomicina utilizando inmunoreactivos y anticuerpos desarrollados con los inmunoreactivos descritos en la presente invención.

Ejemplo 6. Desarrollo de un biosensor óptico para la medición directa de daptomicina

Las superficies de los sensores se limpiaron previamente por inmersión en acetona durante 1 minuto, seguido de un lavado con agua ultrafiltrada y finalmente un secado al aire hasta eliminar toda la humedad. Cuando se utilizaron chips que contenían una capa de 2D SCH CMDP-5 carboximetildextrano en la superficie, se utilizó la activación mediante acoplamiento de aminoácidos, basada en el enlace amino covalente, que consiste en la activación de grupos carboxilo con una mezcla de NHS/EDC (1:1) para crear N-hidroxisuccinimida N-ésteres. El caudal del tampón de funcionamiento fue de 5 μL /min durante la activación.

La solución de inmovilización para los anticuerpos fue 10 mM de tampón de acetato pH 4,1. La dilución 1/1000 en 10 mM tampón de acetato pH 4.1 de los antiseros se inyectó sobre la superficie activada hasta alcanzar el nivel de inmovilización (punto máximo en las curvas de asociación del sensorgrama) a un caudal de 5 μL /min. El exceso de grupos carboxilo que permanecieron activados se bloqueó con clorhidrato de etanolamina (pH 8,5) a un caudal de 5 μL /min. Los datos de concentración superficial son proporcionados por el software del equipo al realizar el análisis.

Se siguieron las guías de calibración ICH para metodologías analíticas. La curva de calibración se realizó enriqueciendo el plasma con DAP. Para llevar a cabo el enriquecimiento se realizaron diluciones seriadas a DAP en un rango de concentración entre 500 – 10000 ng/mL utilizando buffer de PBS 0.01M pH 7.4.

Posteriormente cada una de las diluciones fue inyectada de manera individual sobre la superficie sensora correspondiente a daptomicina. El volumen de inyección de 200 μL en un flujo de 50 μL /min. El resultado obtenido de la unión entre el anticuerpo y el analito fue tomado en el punto máximo de la asociación de los sensogramas 10 s después de la inyección. Después de

cada medición en los ensayos de unión (Ag/Ac), se realizó la regeneración de la matriz empleando NaCl 0.5M como agente de regeneración.

Antibiótico	Límite de detección (LOD)	Límite de cuantificación (LOQ)
DAP	12.3 ng/mL	25 ng/mL

Hasta este punto se ha hecho una descripción detallada de algunas de las modalidades preferidas de la invención, el técnico medio con habilidad en la materia podrá apreciar que es posible realizar variaciones a la materia acá descrita sin alejarse del espíritu de la invención. Por lo tanto, el solicitante respetuosamente le recuerda al examinador que la materia comprendida en la descripción, particularmente en los ejemplos, no es de carácter limitante ya que el objeto y alcance de la protección deseada esta definido por el capítulo reivindicatorio adjunto.