

COMPUESTO INMUNORREACTIVO, ANTICUERPOS OBTENIDOS, BIOSENSOR E INMUNOENSAYOS PARA DETECTAR ANTIBIÓTICOS TIPO VANCOMICINA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto para monitoreo de medicamentos antibióticos, más particularmente para detectar y cuantificar la presencia de antibióticos de última generación empleados para tratar infecciones por bacterias multirresistentes, aún más particularmente, para detectar y cuantificar la presencia de antibiótico tipo vancomicina en tejidos y fluidos de animales, incluido humanos, que han sido tratados con estos antibióticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La resistencia a los antibióticos representa una de las amenazas para la salud pública mundial. El aumento de las bacterias multirresistentes, que podría estarse dando principalmente por 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 (Yamin, *et.al*, 2023).

La resistencia a los antimicrobianos (RAM), debido al uso inadecuado y excesivo de agentes antibióticos tanto en el ámbito clínico como en el veterinario, 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. 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. El 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.

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 (Kao, *et.al*, 2025). 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.

Entre este tipo de antibióticos está la vancomicina, un antibiótico del grupo de los glucopéptidos, cuya estructura química se basa en un heptapéptido cíclico aromático altamente modificado. Presenta varios anillos aromáticos conectados por puentes cruzados que le confieren una conformación tridimensional rígida, además de múltiples grupos hidroxilo, amino y cloro que participan en interacciones con su blanco bacteriano. Su esqueleto peptídico está glicosilado con azúcares, entre ellos glucosa y vancosamina, lo que contribuye a su solubilidad y reconocimiento molecular. En conjunto, se trata de un heptapéptido glicósido clorado con fórmula molecular $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$, diseñado naturalmente para interactuar de manera específica con componentes esenciales de la pared celular bacteriana.

Su función consiste en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, uniéndose con alta afinidad al extremo D-alanil-D-alanina de los precursores del peptidoglicano. De esta manera bloquea la acción de las enzimas transglicosilasa y transpeptidasa, lo que impide el entrecruzamiento de la pared y conduce a la muerte bacteriana. La vancomicina es activa principalmente contra bacterias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Clostridium difficile*, mientras que no resulta eficaz frente a Gram negativas debido a que su gran tamaño le impide atravesar la membrana externa de estas. Es un antibiótico bactericida.

Algunos documentos enseñan el uso de inmunoensayos dirigidos a detectar este antibiótico:

La detección de vancomicina en muestras biológicas se realiza principalmente mediante técnicas cromatográficas e inmunoensayos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV) y sus variantes de alta sensibilidad como LC-MS/MS y UPLC-MS/MS son los métodos de referencia para la monitorización terapéutica (TDM), debido a su alta especificidad y capacidad para cuantificar concentraciones en plasma, suero y otros fluidos en rangos de 1–100 $\mu\text{g/mL}$ (Aboelezz *et al.*, 2025; Parker *et al.*, 2017; Ringeling *et al.*, 2022). Por otra parte, los inmunoensayos como ELISA, pruebas de flujo lateral y formatos automatizados permiten resultados rápidos en matrices como sangre total o suero, aunque pueden presentar reactividad cruzada con metabolitos como CDP-1 (Galvidis *et al.*, 2024; Jung *et al.*, 2024). De manera complementaria, los biosensores han emergido como una alternativa innovadora: los sensores basados en aptámeros, tanto electroquímicos como ópticos mediante resonancia de plasmones superficiales

(SPR), permiten detecciones en tiempo real y regenerables, mientras que los polímeros de impresión molecular (MIP) ofrecen plataformas económicas y portátiles para la determinación de este antibiótico en fluidos biológicos (Liu et al., 2023; Santa et al., 2024). Asimismo, los bioensayos microbiológicos continúan siendo útiles en laboratorios con menor infraestructura tecnológica, aplicando técnicas de difusión en agar para evaluar niveles de antibióticos en fluidos corporales (Zuluaga et al., 2009).

En el caso de muestras no biológicas, la vancomicina puede detectarse en alimentos, aguas y productos farmacéuticos. En tejidos comestibles de origen animal y matrices ambientales, se han validado métodos LC-MS/MS multirresiduo capaces de cuantificar la presencia del antibiótico a niveles traza (Cao et al., 2018; Chan et al., 2022; Chen et al., 2023). En aguas superficiales y residuales, el LC-MS/MS también se utiliza para monitorizar la persistencia ambiental de la molécula (Cao et al., 2018). Para el control de calidad en formulaciones farmacéuticas, se emplean métodos cromatográficos indicativos de estabilidad, capaces de separar vancomicina de sus productos de degradación (Farin et al., 1998). Adicionalmente, sensores híbridos péptido-MIP y nanoMIP acoplados a SPR han demostrado detectar vancomicina en matrices complejas no biológicas como bebidas y miel, mostrando límites de detección bajos y gran selectividad (Altintas et al., 2018;).

La invención US6800608 propone un método homogéneo para la detección de vancomicina mediante inmunoensayos en los que se utilizan conjugados de la molécula con partículas estables, lo que permite una señal amplificada sin necesidad de pasos de separación. Este sistema facilita la cuantificación del antibiótico en fluidos biológicos con mayor rapidez y simplicidad que los ensayos convencionales, haciéndolo útil en el monitoreo terapéutico. Sin embargo, una limitación importante es que la eficacia del ensayo depende de la estabilidad y consistencia de los conjugados partículas-vancomicina, lo que puede verse afectado por condiciones de almacenamiento o interferencias en matrices complejas, reduciendo la reproducibilidad en entornos clínicos rutinarios.

La solicitud de patente CN111103363A describe un método basado en LC-MS/MS para la medición simultánea de la concentración de vancomicina y su producto de degradación cristalino CDP-1 en suero humano. Utiliza norvancomicina como estándar interno, acidifica el suero con

ácido fórmico y precipita las proteínas con acetonitrilo; luego, con una fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua acidificada, cuantifica ambos compuestos (vancomicina y CDP-1) de forma precisa y eficiente, con pequeño volumen de muestra y pretratamiento rápido, lo que resulta especialmente útil para pacientes con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis, y permite ajustar esquemas de dosificación individualizados, mejorar eficacia clínica y reducir toxicidad y resistencia bacteriana. Una limitación de este método es que, al emplear LC-MS/MS, requiere equipos especializados, costosos y personal técnico capacitado, lo que puede dificultar su implementación en laboratorios clínicos con recursos limitados o en entornos con infraestructura tecnológica menos avanzada.

La publicación WO2023038981 presenta un procedimiento para la esterilización y almacenamiento de larga duración de sensores de aptámeros (aptamer-sensors) destinados a mediciones in vivo en humanos, mediante el uso de envases estériles y materiales de conservación anhidros que mantienen tanto el sensor como sus elementos estériles hasta su uso, facilitando su manipulación segura y prolongando su vida útil. Una limitación clave de esta invención es que, a pesar de garantizar la esterilidad y estabilidad en estocaje, no aborda completamente el impacto potencial de los procesos de esterilización sobre la funcionalidad y afinidad del aptámero tras su rehidratación, lo cual podría comprometer la sensibilidad, especificidad o capacidad de unión del sensor una vez reactivado in vivo.

A pesar del avance en tecnologías inmunológicas para detección de antibiótico vancomicina, persiste la necesidad de herramientas rápidas, sensibles y estables para detectar vancomicina en matrices biológicas. El desarrollo de anticuerpos alternativos de alta especificidad dirigidos a antibióticos tipo vancomicina constituye una valiosa contribución. Además, combinar estos anticuerpos con plataformas de detección portátiles (p.ej., biosensores, inmunoensayos tipo “dipstick”) podría facilitar diagnósticos en campo o entorno clínico inmediato.

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 vancomicina, 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 del ambiente.

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

La invención también se refiere al proceso de elaboración del compuesto de fórmula (I) y al proceso de obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales mediante este compuesto.

Un objeto de la invención es un biosensor para detectar antibiótico de tipo vancomicina, en muestras de cualquier tipo. El biosensor puede ser electroquímico u óptico, y comprende:

- a) un elemento transductor (electroquímico o SPR),
- b) una superficie de detección funcionalizada con un compuesto de fórmula (I),
- c) un anticuerpo específico policlonal,
- d) y reactivos enzimáticos o de detección óptica, según el caso.

Otro objeto de la invención es un kit para la detección y/o cuantificación del antibiótico tipo vancomicina, que comprende al menos un anticuerpo o un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente, recipientes y/o soportes para colocar el inmunorreactivo.

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

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Títulos de los antisueros VAN-DMP-BSA. Las placas se recubrieron a 1 μ /mL de bioconjugado competidor y los antisueros se diluyeron 64 000 veces. El título de los anticuerpos para cada uno de los antibióticos fue aumentando a lo largo del tiempo.

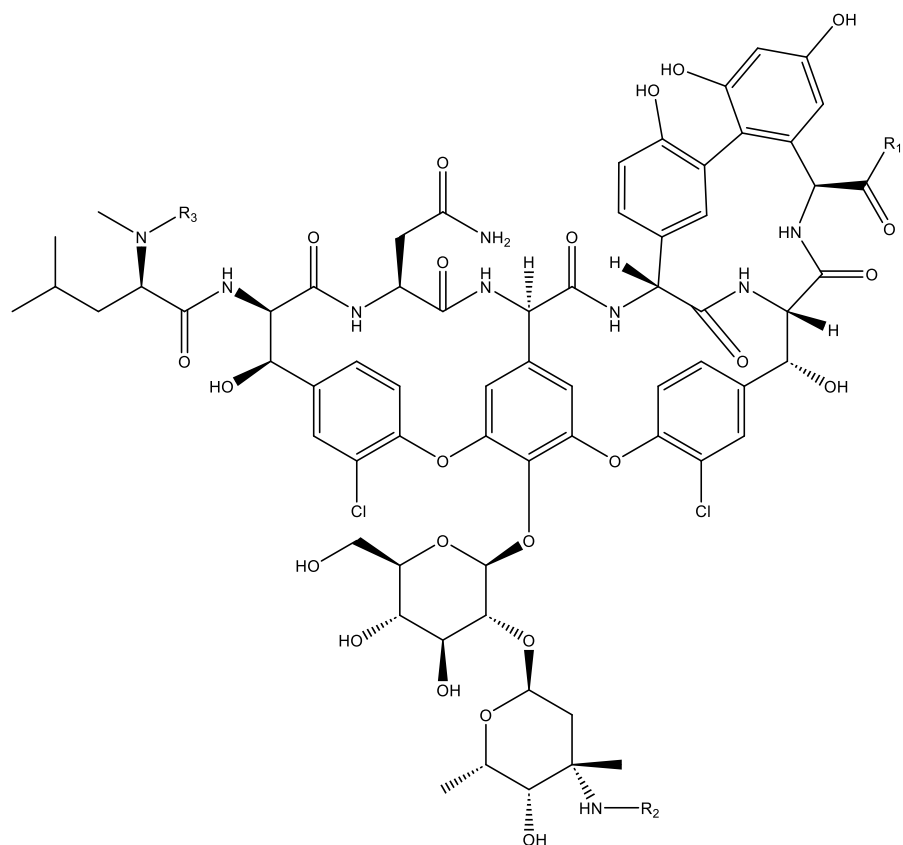
Figura 2. Evaluación de las combinaciones óptimas de inmunorreactivos en un ensayo de competencia indirecta por su capacidad para reconocer su antibiótico analito correspondiente. Las curvas permiten observar que existe una competencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un conjunto de compuestos inmunorreactivos del antibiótico vancomicina. De igual modo se refiere a los inmunorreactivos resultantes de la unión de dichas moléculas de vancomicina a soportes inmunogénicos y al uso de estos en la obtención de anticuerpos con selectividad para el antibiótico vancomicina. A su vez se refiere a la utilización de alguno de dichos inmunorreactivos, a modo de inmunorreactivos secundarios, y de los anticuerpos generados a partir de ellos en métodos inmunoquímicos de análisis y biosensores en muestras biológicas.

Compuesto inmunorreactivo

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



(I)

o sus sales, isómeros o solvatos,

donde,

R₁ se selecciona entre OH, OR₄, NHR₄;

R₂ o R₃ se seleccionan entre H, HR₅R₄;

R₄ es un soporte inmunogénico que se selecciona entre albúmina de suero bovino (BSA), ovalbúmina, peroxidasa de rábano picante (HRP), hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) o hemocianina de cangrejo herradura (HCH);

R₅ es un agente reticulador, que se selecciona entre: dimetil suberimidato dihidrocloruro (DMS·2HCl); C₁₃H₂₆N₂O₄·2HCl, dimetil pimelimidato dihidrocloruro (DMP·2HCl); C₁₂H₂₄N₂O₄·2HCl, o dimetil adipimidato dihidrocloruro (DMA·2HCl);

donde R₄ siempre está presente, pero solo en uno de R₁, R₂ o R₃; y

donde R₅ está presente junto a R₄ en una de las posiciones R₂ o R₃, pero no en ambas.

Tal como se emplea en la presente invención, “soporte inmunogénico” se refiere a aquellos materiales con la propiedad de generar con independencia una respuesta inmune en el animal huésped y que pueden estar unidos mediante enlace covalente a los haptenos descritos en la presente invención. El material soporte idóneo incluye, por ejemplo, compuestos poliméricos naturales o sintéticos, como por ejemplo polipéptidos, oligonucleótidos, también incluye proteínas, como, por ejemplo, albúminas, seroproteínas, globulinas, lipoproteínas, hemocianinas. Ejemplos ilustrativos de soporte inmunogénico incluyen seroproteína bovina, ovalbúmina, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

El término “agente reticulador” se refiere a un agente que estimula la estabilidad en la unión del antibiótico y el soporte inmunógeno. Para el presente caso, se trata de un compuesto bifuncional o multifuncional que puede formar enlaces covalentes entre un hapteno y una proteína portadora, o entre una proteína y un soporte sólido. Algunos ejemplos de posibles compuestos de agentes reticuladores son: $C_{14}H_{28}N_2O_4 \cdot 2HCl$ - dimetil suberimidato dihidrocloruro (DMS·2HCl); $C_{13}H_{26}N_2O_4 \cdot 2HCl$ - dimetil pimelimidato dihidrocloruro (DMP·2HCl); $C_{12}H_{24}N_2O_4 \cdot 2HCl$ - dimetil adipimidato dihidrocloruro (DMA·2HCl) y compuestos conocidos en el estado de la técnica que realicen esta función.

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 y en cuyo caso compiten en disolución con el analito por el anticuerpo inmovilizado sobre el soporte sólido.

Un antibiótico tipo vancomicina, se refiere a antibióticos cuya estructura química y función es similar a la vancomicina. Esto incluye moléculas con sustituciones que no afectan el núcleo estructural y función del compuesto.

Teniendo en cuenta que los compuestos de fórmula (I) poseen grupos y átomos susceptibles de perder o ganar cargas, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I) en forma de sal.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), y más concretamente, los compuestos específicos pertenecientes a esta fórmula general 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.

De otra parte, el proceso de formación del compuesto inmunorreactivo de fórmula (I) se realiza al:

- a) activar un soporte inmunogénico con un agente reticulante;
- b) conjuguar el soporte inmunogénico activado en (a) con un compuesto antibiótico tipo vancomicina.

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.

Particularmente, agentes reticulantes pueden ser cloruro cianúrico, bis-Imidoésteres, bis-N-Succinimidil, diisocianatos o diisotiocianatos, biacilazidas, 5 dihaldehidos, dicetonas o cualquier compuesto susceptible de reaccionar con varios grupos amina por etapas, así como sus mezclas.

Este proceso permite obtener compuestos de fórmula (I) con uniones soporte inmunógeno y compuesto antibiótico en diferentes grupos funcionales de la molécula de vancomicina, lo que da lugar a diferentes conformaciones de radicales con o sin sustitución. Aunque los compuestos

de fórmula (I) se puede formar con uniones potenciales en diferentes lugares de su estructura química, solo hay un punto de conjugación entre la molécula de antibiótico y el soporte inmunogénico por cada compuesto de fórmula (I). De allí, que el proceso permita obtener mezclas de diferentes tipos de compuestos de fórmula (I).

La mezcla de estos compuestos de formula (I) puede darse en cualquier proporción de compuestos, excepto que no está presente el compuesto de fórmula (I) cuando R_1 es OH y R_2 y R_3 son H.

Producción de antígenos

Producción de los bioconjugados se dividió en dos partes, una centrada en la producción de los inmunógenos usados para la producción de anticuerpos y la segunda basada en la preparación de antígenos de tapizado para los ensayos de ELISA.

La primera etapa de la producción de anticuerpos policlonales corresponde a la síntesis del inmunógeno, donde se tuvieron en cuenta las características deseadas para el inmuno-ensayo final, teniendo en cuenta la composición y estructura química del hapteno de antibiótico y las proteínas de conjugación. Para la preparación de los inmunógenos se consideró la estructura química de la vancomicina para determinar los métodos de conjugación. La vancomicina fue acoplada a las proteínas de la albumina de suero fetal bovino (BSA) y hemocianina de herradura de cangrejo (HCH) por el método de éster activo utilizando EDC como carbodiimida.

Para la conjugación se disolvieron 10 mg de las proteínas (BSA o HCH) en PBS 0,01 M; seguido de la adición de una solución de hapteno 10 μ mol en PBS 0,01 M (100 μ l). Posteriormente, se adiciono una solución de NHS (18 μ mol) seguido de la incorporación gota a gota de EDC (18 μ mol), ambas soluciones preparadas en PBS 0,01 M (100 μ l). El pH de la solución final se ajustó a 9 y las mezclas se agitaron durante la noche a temperatura ambiente (TA), para favorecer la reacción.

Los conjugados antibiótico-proteína obtenidos se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna HiTrap desalting Sephadex G-25 Superfine

(Amersham Biosciences) utilizando agua ultrapura como eluyente y se almacenaron liofilizados a -80 °C. Las alícuotas de trabajo se almacenaron a 4 °C en PBS 0,01 M a 1 mg/ml.

Análisis de densidad de hapteno

Las densidades de hapteno de los bioconjugados se calcularon mediante MALDI-TOF-MS comparando el peso molecular de las proteínas nativas (BSA) con el de los bioconjugados. Los espectros MALDI se obtuvieron mezclando 2 µL de la matriz recién preparada (ácido sinapínico, 10 mg mL⁻¹ en ACN, TFA al 0,1 %) con 2 µL de una solución de los conjugados de BSA en ACN/H₂O 50:50, TFA al 0,1 %. (5mg/mL). La densidad de hapteno (δ hapteno) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[\text{MW}(\text{Conjugado}) - \text{MW}(\text{Proteína})] / \text{MW}(\text{Hapteno}).$$

“Agentes reticulantes” se refiere a aquellos compuestos con dos grupos funcionales, generalmente en extremos opuestos de la molécula, capaces de reaccionar con otros grupos funcionales incorporados bien a los haptenos o bien a los soportes inmunogénicos. Si los grupos funcionales con los que deben reaccionar son idénticos, son compuestos de unión homobifuncional y si los grupos con los que deben reaccionar son diferentes, son compuestos de unión heterobifuncional”.

Algunos ejemplos de agentes reticulantes pueden ser: disuccinimidil suberato (DSS), bis(imidoéster) de dimetil suberimidato (DMS), disuccinimidil glutarato (DSG), Succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), N-(γ-Maleimidobutiriloxisuccinimida) éster (GMBS), sulfo-SMCC, imidoésteres, carbodiimida o cualquier otro activador de la reactividad de ácidos carboxílicos, bien procedan del hapteno o del soporte inmunogénico y otros compuestos con esta función conocidos en el estado de la técnica, así como sus mezclas.

Producción de anticuerpos

En un segundo aspecto la presente invención, los compuestos inmunorreactivos de fórmula (I) descritos en la presente invención pueden utilizarse para generar anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, mediante procedimientos bien establecidos en la técnica. Usualmente, el

inmunógeno se inocula a un animal huésped como conejo, ratón, cabra, cobayo o caballo, acompañado de un adyuvante. Luego se realizan refuerzos inmunológicos en el mismo o en diferentes sitios, en intervalos variables, mientras se monitorea la producción de anticuerpos mediante extracciones sanguíneas periódicas.

Una vez alcanzado un título óptimo de anticuerpos, estos pueden obtenerse por sangrado del animal para recolectar antisuero, o mediante técnicas como la hibridación de células somáticas para producir anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos obtenidos pueden conservarse a bajas temperaturas, por ejemplo, a -20°C , para su posterior uso en aplicaciones diagnósticas o terapéuticas.

El término "anticuerpos", tal como se utiliza en esta descripción, incluye no solo inmunoglobulinas completas, sino también fragmentos con capacidad de unión al antígeno, los cuales pueden producirse mediante técnicas conocidas, tales como los fragmentos Fab, F(ab') y Fv.

Asimismo, el método preferido de la invención utiliza anticuerpos que no se unen a metabolitos no deseados. Además, estos anticuerpos se unen a sitios no peptídicos de antibióticos tipo vancomicina.

Estos anticuerpos pueden ser marcados con etiquetas que faciliten su identificación y localización, tal como moléculas con fluorescencia o quimioluminiscencia.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de anticuerpo contra el antibiótico vancomicina que comprende:

- a) activar un soporte inmunogénico mediante un agente de reticulación;
- b) conjugar el soporte inmunogénico activado en (a) con el compuesto inmunorreactivo de fórmula (I);
- c) preparar una composición entre el compuesto de fórmula (I) y un adyuvante apropiado;
- d) inmunizar uno o más animales no humanos con la composición inmunorreactiva obtenido en (c);

e) extraer los anticuerpos generados;
donde la conjugación del paso b) se realiza entre grupos amina y carboxílico con los soportes inmunogénicos, por una reacción seleccionada entre: ésteres, carbodiimida, agente reticulante o cualquier otro activador de la reactividad de ácidos carboxílicos.

El procedimiento según se ha descrito, deja como producto anticuerpos que se unen a antibióticos tipo vancomicina.

Adicionalmente, este proceso de obtención de anticuerpos se une al proceso de formación del compuesto inmunorreactivo de fórmula (I), al incluir este último en la parte inicial del proceso.

El soporte inmunogénico tal como se definió antes, 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.

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.

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 del antibiótico vancomicina 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.

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 del antibiótico vancomicina en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de origen humano y más preferiblemente son muestras de plasma sanguíneo.

Los inmunorreactivos secundarios pueden ser trazadores, bien enzimáticos, fluorescentes, radioactivos o cualquier otro conocido en el estado de la técnica, 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.

En este caso, el proceso para detección y cuantificación de antibióticos tipo vancomicina en una muestra tiene los siguientes pasos:

- a. poner en contacto la muestra con:
 - i. un reactivo de anticuerpo que comprende anticuerpos capaces de unirse específicamente a antibióticos tipo vancomicina producidos con un inmunorreactivo de fórmula (I);
 - ii. compuesto inmunorreactivo de fórmula (I), unido a un soporte o marcado con una etiqueta
- b. medir la cantidad del reactivo marcador en una solución de reacción que se une o no al anticuerpo en función de la cantidad de antibiótico tipo vancomicina en la muestra de prueba;
donde la solución de reacción contiene un anticuerpo capaz de unirse específicamente a antibióticos tipo vancomicina, producidos con un inmunógeno de fórmula (I) y un compuesto inmunorreactivo de fórmula (I), que actúa como inmunorreactivo secundario.

Biosensor para la cuantificación de antibióticos tipo vancomicina, en muestras biológicas.

Otra modalidad de la presente invención se refiere a un biosensor inmunoquímico o inmunosensor diseñado para la cuantificación de antibióticos con margen terapéutico estrecho, particularmente vancomicina, en muestras de cualquier tipo. Preferiblemente, pueden ser

muestras biológicas, más preferiblemente muestras de origen humano, por ejemplo, plasma humano.

El biosensor puede operar bajo dos modalidades de transducción: electroquímica y óptica, utilizando inmunorreacción específica entre el antibiótico y un anticuerpo policlonal desarrollado a partir de un compuesto inmunorreactivo de fórmula I como el de la invención. Ambas modalidades permiten la monitorización terapéutica en tiempo real, con alta sensibilidad y especificidad, siendo aptas para aplicaciones clínicas portátiles o de laboratorio.

Entonces, las modalidades del biosensor son de preferencia:

- Modalidad electroquímica de biosensor (amperométrica)
- Modalidad óptica (resonancia de plasmones superficiales - SPRi)

En una realización preferente, el biosensor comprende:

- a) un elemento transductor (electroquímico o SPR),
- b) una superficie de detección funcionalizada con un compuesto de fórmula (I),
- c) un anticuerpo específico policlonal obtenido a partir del compuesto de fórmula (I),
- d) e inmunorreactivos etiquetados con enzimas o de detección óptica, según el caso.

En este biosensor se coloca la muestra de interés, de forma que permite detectar y cuantificar la presencia de antibiótico de tipo vancomicina.

El compuesto de fórmula (I) podría ser, por ejemplo, un conjugado del antibiótico vancomicina unido a una proteína portadora (VAN-DCC-BSA).

El anticuerpo específico policlonal es el anticuerpo obtenido a partir del proceso de la presente invención donde se emplea el compuesto de fórmula (I) para inmunizar animales.

Los elementos principales de un biosensor óptico de tipo Resonancia de Plasmón Superficial (*Surface Plasmon Resonance*, por sus siglas en inglés -SPR) son:

- chip de oro (con frecuencia recubierto con dextrano o similar);
- ligando inmovilizado (por ejemplo, un anticuerpo);

- analito que se une al ligando (por ejemplo, vancomicina en plasma);
- fuente de luz y sistema de detección (CCD o fotodetector);
- flujo de muestra y sistema de regeneración.

Pero también se incluyen otro tipo de biosensores ópticos conocidos en el estado de la técnica.

Los biosensores propuestos representan una herramienta versátil y eficaz para el monitoreo terapéutico de vancomicina en pacientes con infecciones. Entre sus principales ventajas se destacan:

- alta sensibilidad comparable con técnicas como HPLC,
- regeneración de la superficie sensora,
- bajo costo operativo y portabilidad,
- posibilidad de implementación en el punto de atención clínica (point-of-care).

Asimismo, constituye una solución innovadora para el control preciso de dosis en tratamientos personalizados, contribuyendo al uso racional de antibióticos y a la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

Kit de detección

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la detección y/o cuantificación del antibiótico vancomicina que comprende al menos un anticuerpo o un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente. Así mismo, el kit incluye recipientes para la(s) solución(es) que contiene(n) el (los) anticuerpos de la invención o los compuestos inmunorreactivos de fórmula (I).

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 del antibiótico vancomicina en una muestra biológica

aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de origen humano y más preferiblemente son muestras de plasma sanguíneo. Así mismo, el kit es diseñado para la detección de antibiótico tipo vancomicina en cualquier 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. El uso de términos en singular o en plural se debe entender como intercambiables. 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.

Ejemplos

A continuación, se ilustrará la invención mediante algunos ensayos realizados, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de fórmula (I) como inmunorreactivos para la obtención de anticuerpos anti-vancomicina y desarrollo de inmunoensayos para la detección de antibióticos vancomicina.

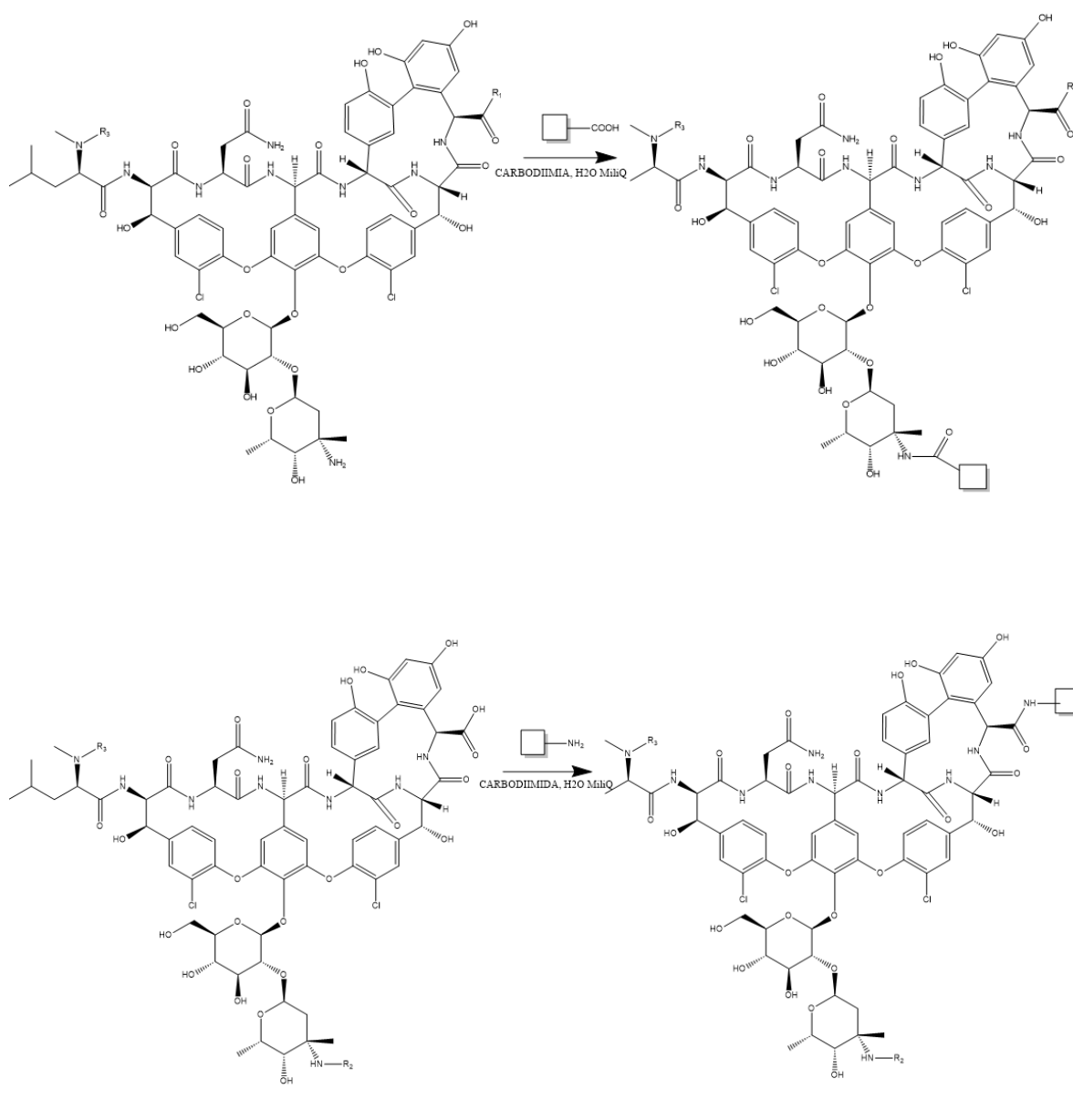
Ejemplo 1. Preparación de los inmunorreactivos

Los inmunorreactivos de fórmula (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica e inorgánica, 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.

a) Vía éster activo

En el caso de haptenos con 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 hapteno o del soporte inmunogénico (véase esquema 1).

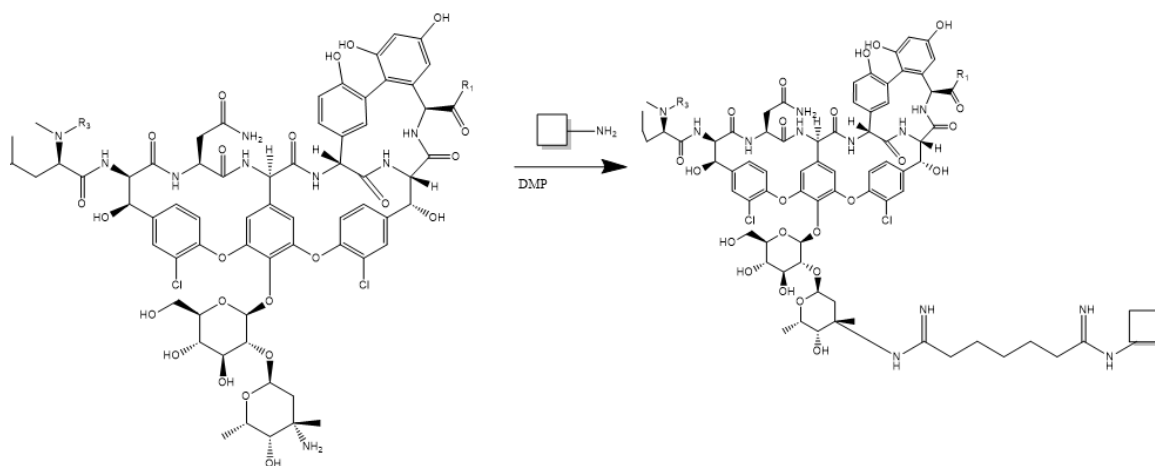
Esquema 1



a) Vía agente reticulador

En el caso de moléculas con grupos amina también se conjugan a los soportes inmunogénicos previamente funcionalizados a través de sus grupos amina usando un compuesto de unión homobifuncional. Dichos compuestos de unión homobifuncional 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 anti-vancomicina y desarrollo de inmunoensayos para la detección de dicho antibiótico.

Ejemplo 2. Ensayos de inmunoquímica

Procedimientos generales y 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).

Análisis de la densidad del hapteno o molécula antibiótica

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-hidroxycinnámico, 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(Conjugado)-PM(Proteína)] / PM(Hapteno).

Caracterización de los anticuerpos.

El pH y la conductividad de todos los tampones y disoluciones se midieron con un pH metro pH 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Las placas de microvaloración de poliestireno se adquirieron de Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK). Las etapas de lavado del ELISA se llevaron a cabo en un lavador de microplacas SLY96 PW (SLT 20 Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Las absorbancias se leyeron en un SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las curvas de competencia se analizaron con una ecuación logística de cuatro parámetros usando el software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices) y GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Mediciones mediante biosensores

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).

Productos químicos e inmunoquímicos

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

Preparación de soluciones 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 0,25 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.

Preparación de inmunorreactivos

- Inmunorreactivo I

La haptenización de los soportes inmunogénicos para el caso de haptenos que poseen un grupo ácido 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.

Para el caso que poseen grupo ácido carboxílico se disolvieron en 100 μ l de DMF y se mezclaron con 50 μ mol de NHS y 100 μ mol de DCC. Las mezclas se dejaron reaccionar bajo agitación magnética durante 3 h a temperatura ambiente, hasta que las soluciones se volvieron turbias debido a la precipitación de la diciclohexilurea. Posteriormente, la solución se centrifugó (10 000 rpm durante 10 min) para eliminar el precipitado, los sobrenadantes se agregaron a la solución de la proteína (10 mg) en solución tampón bórax/borato (100 μ L). Las mezclas de reacción se mantuvieron a temperatura ambiente con agitación magnética durante la noche. Finalmente, las mezclas se purificaron por diálisis frente a PBS 0,5mM (4 veces x 5 L) y agua Milli-Q (1 vez x 5 L) y se almacenaron liofilizadas a -80 °C. Las alícuotas de trabajo se almacenan a 4 °C en PBS 0,01 M a 1 mg/ml.

Utilizando dicha metodología se preparó el siguiente inmunoreactivo: VAN-EDC-BSA. Densidad de Hapteno (mol Hapteno/mol proteína): 3.6. VAN-DCC-BSA. Densidad de Hapteno (mol Hapteno/mol proteína): 4.0.

- Inmunorreactivo II

La haptenización de los soportes inmunogénicos en el caso de haptenos que poseen un grupo amino se realizaron de la siguiente manera. 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. solución de antimicrobiano (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 BSA (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 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.

Utilizando dicha metodología se preparó el siguiente inmunoreactivo: VAN-DMP-BSA. Densidad de Hapteno (mol Hapteno/mol proteína): 4.5.

Preparación de antisueros policlonales.

Se llevó a cabo el protocolo de inmunización en hembras de conejos blancos New Zealand que pesaban 1-2 kg, según se ha descrito anteriormente (Salvador, *Analytical Chemistry*. **2007**, 79, 3734-3740). Los inmunógenos (100 μ g) 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 antisueros 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 antisueros mediante centrifugación y se almacenaron a -80 °C.

Ejemplo 3. Desarrollo de ELISAs competitivos indirectos para vancomicina

Las placas se recubrieron con el correspondiente antígeno de tapizado (formato indirecto) o antisuero (formato directo) disuelto en tampón de de tapizado (100 μ L/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 vancomicina (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 H₂SO₄ (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 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 vancomicina:

Antisuero	Abs max	Abs min	IC ₅₀ (nM)	Pendiente	LOD (nM)
Rb157	0,89	0,29	0,05	-0,60	0.002
Rb158	1,29	0,02	0,3	-0,63	0.009
Rb159	1,22	0,10	0,29	-0,57	0.006

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

La avidéz de los antisueros (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. En general, las combinaciones heterólogas obtuvieron mayores absorbancias en comparación con los ensayos homólogos porque las heterólogas demuestran más afinidad con el anticuerpo (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).

Ejemplo 4. Desarrollo de un biosensor electroquímico para la medición indirecta de vancomicina

Los amperogramas se adquirieron a un potencial aplicado de -0.10 V vs. el electrodo de referencia de Ag durante 60 s. Las señales se adquirieron en la tasa de flujo descrita anteriormente. La señal registrada fue el valor medio de la corriente obtenida en los últimos 20 seg, 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 vancomicina:

Antibiótico	I_{min}	I_{max}	Pendiente	IC₅₀ suero diluido(nM)	IC₅₀ real (nM)	LOD suero diluido (nM)	LOD real (nM)
VAN	0.118	1.551	-0.296	2.41	241	0.011	1.1

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

La IC₅₀ marca la concentración de Vancomicina que es capaz de detectar el biosensor en la mitad de su rango de trabajo y el LOD la concentración mínima detectable. En cuanto al real y diluido, debido al efecto matriz del plasma, este se diluye 100 veces y se mide por el biosensor, por eso el real es 100 veces más concentrado que el diluido.

Ejemplo 5. Desarrollo de un biosensor óptico para la medición directa de vancomicina

Al igual que las curvas de calibración realizadas para el biosensor electroquímico se siguieron las guías ICH para metodologías analíticas. La curva de calibración se realizó enriqueciendo el plasma con cada uno de los antibióticos. Para llevar a cabo el enriquecimiento se realizaron diluciones seriadas a cada antibiótico 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 vancomicina. El volumen de inyección de 200 μ L en un flujo de 50 μ L/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 seg después de la inyección. Después de cada medición en los ensayos de unión (Ag/Ac), se realizó la regeneración de la matriz, asegurando que entre cada medición el analito no interfiriera con las nuevas mediciones. Para ello, previamente fue elegido el agente de regeneración de acuerdo con protocolos reportados en la literatura basados en la naturaleza química del analito y el ligando. Después de los ensayos de regeneración, el agente escogido fue NaCl 0.5M

Antibiótico	LOD	LOQ
VAN	19 ng/mL	28 ng/mL

El biosensor SPRi obtuvo un límite de detección de 19 ng/mL y un límite de cuantificación de 28 ng/mL para vancomicina en plasma tratado. La regeneración de la superficie sensora se realizó con NaCl 0.5 M, permitiendo múltiples ciclos de análisis sin pérdida significativa de señal.

Referencias bibliográficas

Abuelezz, A., Tesfamariam, N. S., Kharouba, M., Gligoric, T., & Mahmoud, S. H. (2025). The development and validation of a simple HPLC-UV method for the determination of vancomycin concentration in human plasma and application in critically ill patients. *Molecules*, 30(5), 1062.

Cao, M., *et al.* (2018). Studies on the metabolism and degradation of vancomycin in the environment. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1286.

- Chan, C. L., *et al.* (2022). A universal LC-MS/MS method for simultaneous detection of antibiotics in animal and environmental samples. *Antibiotics*, 11(7), 898.
- Chen, X., *et al.* (2022). Development and validation of an UPLC-MS method for therapeutic drug monitoring of multiple agents including vancomycin. *Annals of Clinical Biochemistry*, 59(4), 308–316. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/00045632221077183>
journals.sagepub.com
- Chen, Q., *et al.* (2023). Determination of trace vancomycin in edible animal tissues by LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 404, 134666.
- Galvidis, I. A., *et al.* (2024). Therapeutic monitoring of vancomycin implemented by ELISA using anti-eremomycin antibodies. *Antibiotics*, 13(6), 573.
- Kao, K., & Alocilja, E. C. (2025). A Review of the Diagnostic Approaches for the Detection of Antimicrobial Resistance, Including the Role of Biosensors in Detecting Carbapenem Resistance Genes. *Genes*, 16(7), 794.
- Liu, Y., *et al.* (2023). Analytical validation of aptamer-based serum vancomycin sensors. *ACS Sensors*, 8(12), 4081–4090.
- Parker, S. L., *et al.* (2017). LC-MS/MS to determine vancomycin in plasma with HILIC. *Journal of Chromatography B*, 1059, 38–44.
- Ringeling, L. T., *et al.* (2022). Quantification of vancomycin in plasma y líquido sinovial por LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1192, 123162.
- Santa, C., Park, S., Gejt, A., Clark, H. A., Hengerer, B., & Sergelen, K. (2024). Real-time monitoring of vancomycin using a split-aptamer surface plasmon resonance biosensor. *The Analyst*, 150(1), 131–141. <https://doi.org/10.1039/d4an01226g>

Yamin, D., Uskoković, V., Wakil, A. M., Goni, M. D., Shamsuddin, S. H., Mustafa, F. H., & al. (2023). Current and Future Technologies for the Detection of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Diagnostics*, 13(20), 3246.

Zuluaga, A.F., Agudelo, M., Rodriguez, C.A. et al. Application of microbiological assay to determine pharmaceutical equivalence of generic intravenous antibiotics. *BMC Clin Pharmacol* 9, 1 (2009).