

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 426**

51 Int. Cl.:

C07D 241/46 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2014 PCT/ES2014/070161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14135730**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2014 E 14760605 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2966066**

54 Título: **Haptenos y conjugados derivados de piocianina, anticuerpos de los mismos, y método inmunoquímico para la detección de infecciones provocadas por pseudomonas aeruginosa**

30 Prioridad:

05.03.2013 ES 201330312

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.05.2018

73 Titular/es:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (33.3%)

C/ Serrano 117

28006 Madrid, ES;

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA (UAB) (33.3%) y

CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED M.P. (33.3%)

72 Inventor/es:

MARCO COLÁS, MARÍA PILAR;

PASCUAL DURÁN, NURIA;

PASTELLS DíEZ, CARME;

SANCHEZ BAEZA, FRANCISCO;

VILLAVERDE CORRALES, ANTONIO PEDRO y

RODRÍGUEZ CARMONA, ESCARLATA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 669 426 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Haptenos y conjugados derivados de piocianina, anticuerpos de los mismos, y método inmunoquímico para la detección de infecciones provocadas por *pseudomonas aeruginosa*

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con compuestos de fórmula general I, su uso como haptenos, sus conjugados y el uso de los mismos para la obtención de anticuerpos. Asimismo, la invención también se relaciona con un método para la detección y/o cuantificación de piocianina y/o 1-hidroxifenazina que utiliza los anticuerpos y conjugados de la invención para la detección de infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las Infecciones Nosocomiales (IN) siguen siendo hoy en día una de las primeras causas de muerte en los países en desarrollo. Se estima que cada año en la Unión Europea (UE) 4 millones de pacientes adquieren una IN y aproximadamente 37000 de ellos mueren como consecuencia directa de la infección. *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo oportunista frecuentemente aislado en las unidades de cuidados intensivos (UCI), presente en neumonías, fibrosis quística (FQ), infecciones del torrente sanguíneo y algunas enfermedades inmunosupresoras. La actual falta de herramientas de diagnóstico específicas es la causa de la prescripción de antibióticos de amplio espectro, los cuales matan a una gran parte de las bacterias debido a la ignorancia del verdadero microorganismo responsable de la enfermedad. La formación de biopelículas es una característica importante de *P. aeruginosa* que contribuye significativamente a la resistencia antimicrobiana y a la cronicidad de estas infecciones (*Nature* **2000**, 407 (6805), 762-764). Según el informe del European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), *P. aeruginosa* es resistente a piperacilina, ceftazidima, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenems, y la resistencia combinada es común en el 15% de los aislamientos resistentes al menos a tres clases de antibióticos, y un 5% de los aislamientos resistentes a todos los antimicrobianos de las cinco clases bajo vigilancia. Una infección por *P. aeruginosa* involucra muchos factores de virulencia, tales como proteasas, hemolisinas, exotoxina A y metabolitos secundarios tales como piocianina (1-metoxi-5-metil fenazina) y 1-hidroxifenazina. Se ha informado de que la piocianina está relacionada con las bacterias de detección de quórum (*FEMS Microbiol Lett* **2009**, 290, 1-9, *Molecular Microbiology* **2006**, 61 (5), 1308-1321). Debido a su naturaleza zwitteriónica puede penetrar las membranas celulares y generar especies reactivas de oxígeno en el ciclo redox intracelular, produciendo un amplio daño amplio en las células humanas.

15

20

25

30

35

40

45

50

Actualmente, los métodos de identificación de patógenos se basan en el enriquecimiento clásico de cultivo celular seguido de la identificación por medios bioquímicos. Estos métodos consumen tiempo y la detectabilidad lograda a menudo no es suficiente a menos que se empleen largos períodos de enriquecimiento de células de cultivo (mínimo de 24 horas). Estos tiempos largos de diagnóstico son inaceptables en el caso de una sepsis en la que el paciente puede entrar en shock en un período de 24-48 h. Para mejorar los actuales métodos de detección, se han introducido métodos de PCR que amplifican y secuencian una diana específica de ADN del microorganismo. Los métodos de amplificación de ADN dan importantes conocimientos sobre el genoma de las bacterias, sin embargo, estas técnicas presentan limitaciones considerables relacionadas con la necesidad de ser realizada por personal altamente cualificado, el requisito de la extracción de ADN el cual es un proceso tedioso y requiere etapas de purificación para amplificar los materiales genéticos, y, a pesar de estos esfuerzos, hay grandes dificultades para poner en práctica estos procedimientos como dispositivos que puedan ser adecuados para ejecutarse en pequeños laboratorios locales, evitando la necesidad de transportar las muestras a instalaciones centralizadas. Alternativamente, los métodos de análisis inmunoquímicos, ya bien aplicados en los laboratorios clínicos, han evolucionado hacia dispositivos inmunosensor sofisticados y eficientes capaces de proporcionar respuestas en tiempo real en presencia de una diana particular en combinación con recientes descubrimientos en principios de la nanobiotecnología y enfocar los beneficios para que puedan satisfacer las necesidades para el campo de diagnóstico clínico.

Con respecto a *P. aeruginosa*, ciertos autores han seleccionado el pigmento piocianina como un objetivo para mejorar la vigilancia de este patógeno, debido a su especificidad para esta especie. Se han descrito métodos de HPLC para la cuantificación de piocianina y su metabolito 1-hidroxifenazina en matrices biológicas (*Trends in Molecular Medicine* **2004**, 10 (12), 599-6069, *European Journal of Biochemistry* **1986**, 159 (2), 309-313), sin embargo, no son adecuados para el diagnóstico clínico ya que se requiere extracciones y procedimientos de purificación que aumentan y complican significativamente el tiempo de análisis. Más recientemente, también se ha publicado un sensor de fibra de carbono para la detección de piocianina (*Bioelectrochemistry* **2010**, 77 (2), 114-119), alcanzando concentraciones tan altas como 130 μM en la detección de muestras de esputo proveniente de pacientes con FQ. Sin embargo, este método no es completamente específico, ya que otras sustancias redox reactivas podrían generar señal, debido a la falta de un receptor específico. En cuanto a los métodos inmunoquímicos, altamente específicos y sensibles y que además ofrecen la posibilidad de diferentes formatos de ensayo, no han sido empleados para la detección de infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* basadas en la detección de piocianina y/o sus metabolitos.

55

60

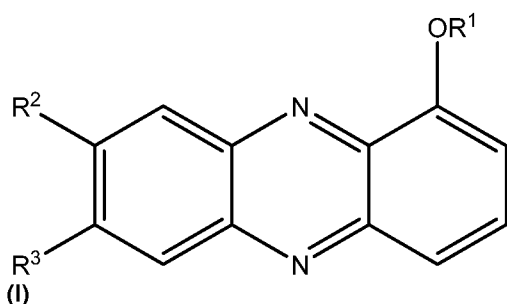
65

Se han publicado estructuras de tipo fenazinas, como el compuesto ácido 9-hidroxifenaziniil-2-carboxílico (Chem.Pharm. Bulletin 1959, 7, 88), así como derivados de piocianina con posible uso como agentes anticancerígenos cuya síntesis describe compuestos intermedios de tipo fenazina (US4845222) pero no se ha descrito su uso como haptenos.

5 Por tanto, existe una necesidad en el estado de desarrollar metodologías alternativas a las descritas en la técnica para la detección de infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* en muestras biológicas, en particular mediante métodos inmunoquímicos

10 **COMPENDIO DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un compuesto de fórmula general I:



donde

R¹ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo;

R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴;

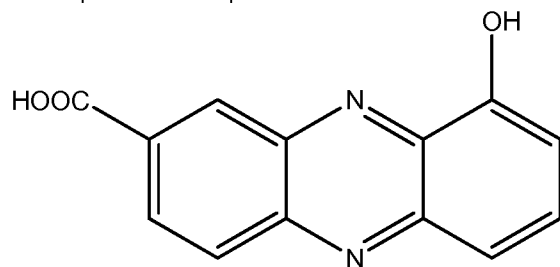
R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴;

20 R⁴ se selecciona entre H y OR⁵;

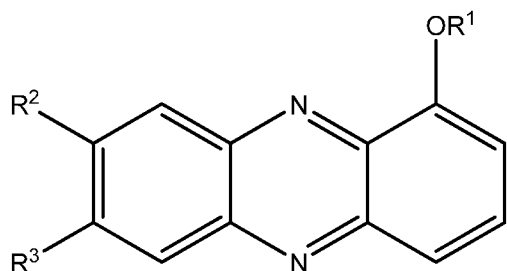
R⁵ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6;

con la condición que dicho compuesto no es



ni tampoco

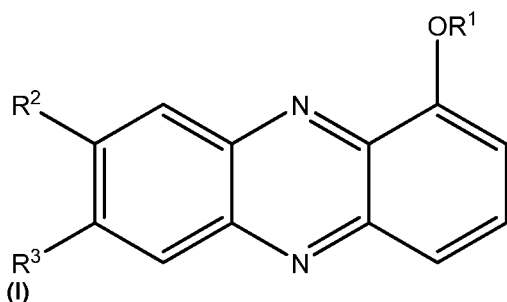


donde

R¹ se selecciona entre H y C₁₋₂alquilo, R² es (CH₂)₁₋₃COOR⁵, R³ es H y R⁵ se selecciona entre H y CH₃ (I-b); o

R¹ se selecciona entre H y C₁₋₂alquilo, R² es H, R³ es (CH₂)₁₋₃COOR⁵ y R⁵ se selecciona entre H y CH₃ (I-c).

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el uso de al menos un compuesto de fórmula general I como hapteno (en adelante hapteno de la invención):



donde

R¹ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo;

R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴;

R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴;

R⁴ se selecciona entre H y OR⁵;

R⁵ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6;

En otro aspecto, la invención se relaciona con un conjugado, también referido en la presente descripción como conjugado de la invención, que comprende al menos un hapteno de fórmula I (hapteno de la invención) como cualquiera de los definidos anteriormente, y un segundo componente que es una proteína transportadora o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un conjugado según la invención que consiste en crear una unión covalente entre el hapteno de fórmula I y la proteína, bien sea directamente o a través de un grupo de unión.

Aún en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un conjugado según la invención para la obtención de anticuerpos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo obtenido frente al menos un conjugado de la invención, o un polipéptido que tenga al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo con capacidad de unión al antígeno.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del anticuerpo anterior en la detección y/o cuantificación de piocianina y/o 1-hidroxifenazina para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* en una muestra de un sujeto.

Aún en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección y/o cuantificación de piocianina y/o 1-hidroxifenazina para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* en una muestra que comprende el uso de un anticuerpo según la invención o de un fragmento del mismo con capacidad de unión al antígeno.

En un último aspecto, la invención se relaciona con un kit para la detección y/o cuantificación de piocianina y/o 1-hidroxifenazina en una muestra de un sujeto que comprende al menos un conjugado según la invención y al menos un anticuerpo anti-fenazina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Curva de calibración del ELISA As230/PC1-BSA (AE) utilizado para el análisis de 1-hidroxifenazina (1-OHphz) (superior) y 1-hidroxifenazina después de la conversión de piocianina a este metabolito (inferior). **Superior:** Curva de calibración preparada en PBhST y esputo diluido 1/20 (Leyenda: □ PBhST; ▲ Esputo 1:20). **Inferior:** Curva de calibración preparada en tampón de hidrólisis y esputo hidrolizado diluido 1/20. Los datos de la curvas de tampón corresponden a una media de N=3, donde cada medida está realizada por triplicado, los datos mostrados para las curvas en esputo son el promedio y desviación estándar de al menos dos pocillos replicados (Leyenda: □ Tampón de Hidrólisis; ▲ Esputo 1:20 en PBS 250 mM). Ver la tabla 1 para conocer los parámetros del inmunoensayo. El esputo es una mezcla de esputos de 10 individuos no contaminados por *P. aeruginosa*.

Figura 2. La precisión se evaluó mediante el análisis de muestras dopadas de piocianina y 1-hidroxifenazina en tampón. **Superior:** Muestra los estudios de precisión de 1-hidroxifenazina en PBST [Leyenda: □ 1-hidroxifenazina, $y = (1,03 \pm 0,02)x + (3,05 \pm 2,55)$, $R^2 = 0,992$]. **Inferior:** Muestra los estudios de precisión de muestras dopadas de 1-hidroxifenazina y piocianina en tampón y cuantificadas después del tratamiento de hidrólisis [Leyenda: □ 1-hidroxifenazina, $y = (0,94 \pm 0,05)x - (3,66 \pm 6,23)$, $R^2 = 0,953$; △ Piocianina $y = (0,97 \pm 0,05)x - (3,42 \pm 6,40)$, $R^2 = 0,943$]. Los datos mostrados son la media y el error asociado de tres pocillos de replicado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han diseñado haptenos estructuralmente relacionados con la piocianina, una toxina secretada por la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, y sus derivados, tales como la 1-hidroxifenazina para la producción de anticuerpos específicos contra estos compuestos. En particular, con los anticuerpos producidos se ha desarrollado una herramienta de diagnóstico que permite la cuantificación de 1-hidroxifenazina y/o piocianina en muestras biológicas de pacientes susceptibles de tener esta bacteria.

La presente invención tiene su clave en el diseño y la síntesis de haptenos de inmunización, cuya estructura ha permitido la producción de anticuerpos específicos. Los inventores han determinado las estructuras y síntesis de dichos haptenos, bioconjugados hapteno-proteína, el procedimiento inmunoquímico de análisis y su evaluación con muestras de pacientes. Los anticuerpos y el ensayo correspondiente son válidos para su empleo en cualquier tipo de configuración inmunoquímica de análisis como por ejemplo formatos de tipo ELISA, ensayo de flujo lateral (LFIA, lateral-flow immunoassay) o de tira, Western-blot, inmunoturbidimetría o inmunosensores. También son útiles para la preparación de sistemas de extracción por inmunoespecificidad, ya sean, aunque sin limitarse, mediante columnas de inmunoespecificidad o partículas biofuncionalizadas con el anticuerpo, o cualquier otro tipo de soporte que permita el anclaje del anticuerpo para el posterior uso del material biohíbrido para la extracción mediante interacciones específicas con el anticuerpo.

Definiciones

El término "antígeno" hace referencia a una molécula, tal como un péptido, un hidrato de carbono, un glicolípido, una glicoproteína o una molécula pequeña que es reconocida y se une a un anticuerpo. La parte del antígeno que es la diana de la unión del anticuerpo corresponde al determinante antigénico. En el contexto de la presente invención, el antígeno hace referencia a un hapteno de acuerdo a la invención conjugado con una proteína transportadora, siendo dicho conjugado el que es reconocido y se une a los anticuerpos específicos obtenidos contra los compuestos fenazínicos de la invención.

En el contexto de la presente invención, un "inmunógeno" es un conjugado de acuerdo a la invención capaz de desencadenar una respuesta inmune. El término "antisuero" se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal.

El término "adyuvante" hace referencia a un compuesto, natural o sintético, que al ser administrado junto con un inmunógeno, aumenta de forma no específica la intensidad de la respuesta inmune generada frente a dicho inmunógeno. Los adyuvantes tienen cuatro modos de acción principales: mejorar la captación y la localización de antígenos, liberación de antígeno extendida, activación de macrófagos y estimulación de las células B y T. Los adyuvantes más comúnmente utilizados se clasifican en seis categorías: sales minerales, emulsiones de aceite, productos de micobacterias, saponinas, productos sintéticos y citoquinas. Los adyuvantes incluyen, sin limitarse a, adyuvante de Freund, completo o incompleto, adyuvante de oro Titermax, alumbre y LPS bacteriano.

El término "anticuerpo", tal como aquí se utiliza en la presente invención, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreactiva) con un antígeno, tal como, por ejemplo, una proteína. Hay 5 isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE). El término "anticuerpo" comprende a cualquier tipo de anticuerpo conocido tales como, pero sin limitarse a por ejemplo, anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. En el contexto de esta invención el término anticuerpo se refiere a la inmunoglobulina que el animal o una célula híbrida ha sintetizado de forma específica contra el hapteno de la invención conjugado.

Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones homogéneas de anticuerpos idénticos, producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral, que están dirigidos contra un único sitio o determinante antigénico. Los "anticuerpos policlonales" incluyen poblaciones heterogéneas de anticuerpos, que están dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

El término "conjugado" hace referencia en la presente invención al complejo formado por la unión covalente de un hapteno de acuerdo con la invención y un segundo componente que se selecciona del grupo formado por una proteína transportadora o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad, una etiqueta detectable y un polímero o un soporte, en particular hace referencia al complejo hapteno-proteína transportadora. Métodos para la obtención de conjugados hapteno-proteína transportadora son conocidos por el experto en la materia.

El término "etiqueta detectable" o "agente de marcaje" hace referencia a una etiqueta molecular que permite la detección, localización y/o identificación de la molécula a la que está unido, mediante procedimientos y

equipamiento adecuados para la detección, bien mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Preferentemente los agentes de marcaje detectables se seleccionan de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva, una sustancia fluorófora, nanopartículas o una mezcla de las mismas. A modo ilustrativo, no limitativo, ejemplos de enzimas pueden ser peroxidasa, glicosidasa, fosfatasa

5 alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, luciferasa, etc. Ejemplos no limitativos de sustancias (químico)luminiscentes son dioxetanos, acridinios, fenantridínios, rutenio, luminol, etc. Ejemplos, no limitativos, de sustancias radioactivas son azufre, yodo, etc., específicamente radioisótopos o radionúclidos que pueden incluir, sin limitación, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I . Ejemplos

10 no limitativos de compuestos fluorescentes o fluoróforos pueden ser fluoresceína, rodamina, fósforos lantánidos, FITC, etc. El agente de marcaje detectable también puede ser una nanopartícula y otros tipos de marcadores particulados (látex, oro, puntos cuánticos), complejos metálicos (Tb^{3+} , Eu^{3+}), cofactores enzimáticos (FAD), etc.

Por "fenazina" o "compuesto fenazínico de la invención", se hace referencia en la presente invención a un compuesto químico que mantiene la parte de la estructura química de dos anillos de benceno unidos entre sí por un

15 anillo de benceno interior en el que los dos átomos de carbono han sido reemplazados por átomos de nitrógeno que es segregado por *Pseudomonas aeruginosa* y que es responsable de su reconocimiento específico por parte de los anticuerpos de la invención. Preferentemente, las fenazinas segregadas por *Pseudomonas aeruginosa* son piocianina y/o 1-hidroxi-fenazina.

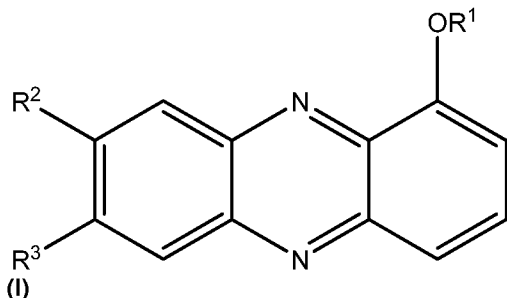
El término "alquilo C_{1-4} " se refiere en la presente invención a un radical derivado de un alcano monovalente (hidrocarburo), de cadena lineal o ramificada, que contiene de uno a cuatro átomos de carbono, e incluye grupos como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo o tert-butilo. Análogamente, el

20 término "alquilo C_{1-2} " se emplea en esta memoria para referirse a grupos alquilo de 1 ó 2 átomos de carbono, como son grupos metilo o etilo.

El término "hapteno", tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una molécula de bajo peso molecular que por sí sola no es capaz de generar una respuesta inmune en un animal y necesita estar unida a una molécula portadora para generar una respuesta inmune. Por lo tanto, el hapteno es una molécula

25 pequeña de carácter no-inmunógeno con capacidad de inducir la formación de anticuerpos cuando está unida a una molécula portadora, en particular una proteína portadora. En la presente invención, el hapteno es un análogo estructural de la piocianina de fórmula I:

30



El término "proteína portadora" o "proteína transportadora" o "portador", en el contexto de la presente invención, hace referencia a una proteína o a un fragmento de la misma que, al unirse a un hapteno, es responsable de que dicho hapteno, en un organismo animal, se convierta en un inmunógeno con la capacidad de inducir la

35 formación de anticuerpos. En dicho conjugado el hapteno es el responsable de inducir la especificidad deseada en la respuesta inmune, y la molécula transportadora es la responsable de conferir antigenicidad al hapteno, esto es, la capacidad de comportarse como un antígeno. Las proteínas útiles como moléculas transportadoras para esta invención son proteínas con una masa molecular superior a 10 kDa, preferiblemente superior a 15 kDa. Ejemplos de

40 proteínas transportadoras de acuerdo a la invención incluyen, sin limitarse a, hemocianina de cangrejo herradura (HCH), hemocianina de lapa (KLH), seroalbúmina de diversas especies tal como la seroalbúmina bovina (BSA), de conejo (RSA), peroxidasa de rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA), conalbúmina (CONA), tiroglobulina y fibrinógeno, así como fragmentos de dichas proteínas que confieren antigenicidad. Proteínas transportadoras preferidas según la

45 invención son hemocianina de cangrejo herradura (HCH) y seroalbúmina bovina (BSA).

El término "técnica inmunoquímica de análisis" es un método inmunoquímico de análisis en el que se emplea un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. La técnica inmunoquímica de análisis se

50 caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigir y/o cuantificar el antígeno. Las técnicas inmunoquímicas comprenden, sin limitarse a, inmunoensayos tales como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), LFIA (Lateral-flow immunoassay) Western-blot, RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo de enzima competitivo), DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA), técnicas

55 inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips de biomarcadores, de biosensores o microarrays que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como los "dipsticks". Dentro de otras técnicas inmunoquímicas también se encuentran los inmunosensores cuyo principio de transducción puede ser óptico, electroquímico, piezoeléctrico, másico o

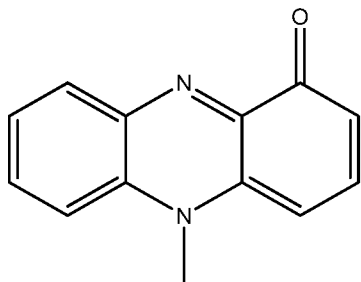
termométrico. Igualmente, también se incluyen los inmunosorbentes o sistemas de extracción por inmovilización, que permiten la extracción selectiva del analito en el seno de una mezcla compleja. Estos sistemas, suelen ser materiales biohíbridos, resultado de la unión estable del anticuerpo a un soporte sólido (polímero, material inorgánico, partículas metálicas, etc.), y que se utilizan para la separación o extracción del analito del resto de componentes de la matriz.

El término "método de detección" hace referencia a un método que permite establecer si una muestra determinada comprende o no comprende 1-hidroxifenazina y/o piocianina con una sensibilidad y especificidad adecuadas. Los intervalos típicos de sensibilidad de detección pueden estar entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 90% de la señal máxima.

El término "método de cuantificación" hace referencia a un método que permite establecer la concentración de 1-hidroxifenazina y/o piocianina presente en una muestra. Los intervalos típicos de cuantificación pueden estar entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 80% de la señal máxima.

El término "muestra", tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una muestra a analizar por el método de la invención, susceptible de contener las fenazinas de la invención, en especial piocianina y/o 1-hidroxifenazina como marcadores de infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*, que ha sido previamente obtenida a partir del sujeto bajo estudio (salvo que se indique lo contrario). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de muestras incluyen tanto muestras biológicas de tejidos como de fluidos corporales, como por ejemplo, sangre, suero, plasma, saliva, esputo, supuraciones del oído, lavados bronquiales, exudados tisulares, etc. En una realización particular, dicha muestra es esputo. En otra realización particular, dicha muestra es plasma. Además, la muestra puede proceder por ejemplo de de cultivos celulares, muestras medioambientales tales como agua, suelo o superficie.

El término "piocianina", tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una toxina secretada por la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. La piocianina, así como sus metabolitos, en especial 1-hidroxifenazina pueden utilizarse como marcador de la infección de un organismo por *Pseudomonas aeruginosa*.



Piocianina

Las expresiones "se une específicamente a" o "específicamente inmunorreactivo con", en relación a un anticuerpo, se refieren a una reacción de unión que es determinante de la presencia de un antígeno o de un inmunógeno determinado en presencia de una población heterogénea de proteínas, sacáridos y otros productos biológicos. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo establecidas, los anticuerpos específicos se unen preferentemente a un antígeno o a un inmunógeno particular y no se unen en cantidad significativa a otras moléculas presentes en la muestra. La unión específica a un antígeno o a un inmunógeno en tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para un antígeno o inmunógeno particular. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayos para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con un antígeno o inmunógeno particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con un antígeno. Véase, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que se pueden usar para determinar la inmunoreactividad específica.

Las expresiones "se une específicamente (o selectivamente) a un anticuerpo" o "específicamente (o selectivamente) inmunorreacciona con", cuando se refiere a una proteína o péptido, en particular en el contexto de la presente invención a un conjugado con carácter inmunógeno de acuerdo a la invención, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del conjugado, con frecuencia en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular al menos dos veces el nivel de fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el nivel de fondo. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales hechos contra la proteína IgE, variantes polimórficas, alelos, ortólogos y variante conservadoramente modificadas, o variantes de ajuste, o partes de las mismas, se pueden seleccionar para obtener solo esos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con proteínas IgE y no con otras proteínas. Esta selección se puede lograr

restando los anticuerpos que dan reacción cruzada con otras moléculas. Se pueden usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular.

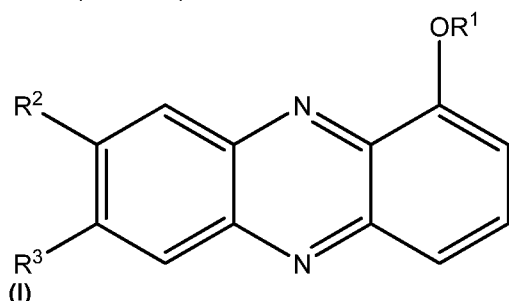
El término "soporte", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier material sólido al que los componentes de la invención, en particular los anticuerpos, los haptenos o los bioconjugados de la invención, se encuentran unidos físicamente, quedando así inmovilizados. Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de soportes sólidos en los inmunoensayos de la presente invención. Los materiales adecuados para el soporte sólido son sintéticos como poliestireno, cloruro de polivinilo, poliamida u otros polímeros sintéticos, polímeros naturales tales como celulosa, así como polímeros naturales derivados tales como acetato de celulosa o nitrocelulosa, y vidrio, especialmente fibras de vidrio. El soporte puede tomar la forma de esferas, bastones, tubos, y placas de microensayo o microtitulación. Las estructuras similares a láminas tales como tiras de papel, placas pequeñas y membranas también son adecuadas. La superficie de los soportes puede ser permeable e impermeable para soluciones acuosas. Soportes sólidos inorgánicos adicionales adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, silicona, cristal, cuarzo, cerámica, metales y sus óxidos, silicio, silicios, siliciuros, nitruros, carburo de silicio amorfo así como cualquier otro material adecuado para microfabricación o microlitografía. Soportes sólidos orgánicos adicionales adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación polímeros como poliimida, acrilato, polimetilmetacrilato, poliestireno o nitrocelulosa.

En la presente invención, el término "polímero" se refiere a una macromolécula formada por la unión de una cantidad finita de moléculas más pequeñas llamadas monómeros, que le confieren un alto peso molecular, en forma sólida, líquida o de gel, soluble o insoluble en medios orgánicos o acuosos. El término polímero incluye oligómeros y tanto homopolímeros como copolímeros, y puede seleccionarse entre polímeros naturales y sintéticos. Ejemplos de polímeros útiles en la presente invención son, sin limitarse a, dextrano simple o modificado, polipirrol, polianilina, ácido poliláctico, polietilenglicol o polilisina.

El término "sujeto", como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se limita a, los animales domésticos y de granja, los primates y los seres humanos, por ejemplo, seres humanos, los primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto o paciente es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

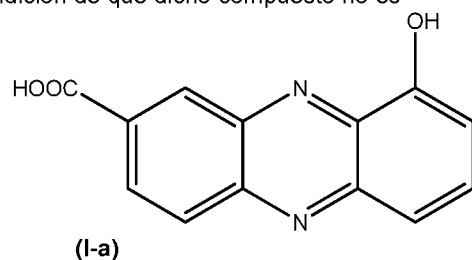
Hapteno de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un compuesto de fórmula general I:

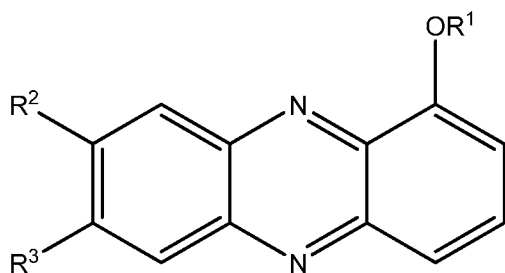


donde

- R¹ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo;
 - R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴;
 - R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴;
 - R⁴ se selecciona entre H y OR⁵;
 - R⁵ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo
 - m es un número entero seleccionado entre 0 y 6;
- con la condición de que dicho compuesto no es



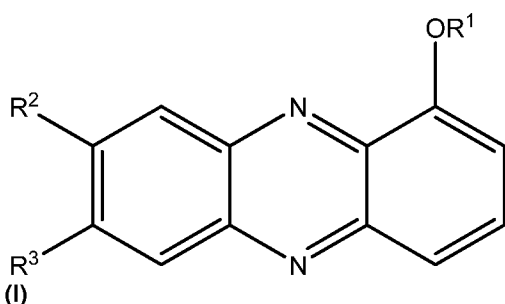
ni tampoco



donde

- 5 R¹ se selecciona entre H y C₁₋₂ alquilo, R² es (CH₂)₁₋₃COOR⁵, R³ es H y R⁵ se selecciona entre H y CH₃ (**I-b**); o
 R¹ se selecciona entre H y C₁₋₂ alquilo, R² es H, R³ es (CH₂)₁₋₃COOR⁵ y R⁵ se selecciona entre H y CH₃ (**I-c**).

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el uso de al menos un compuesto de fórmula general I:



10 donde

R¹ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo;
 R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴;
 R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴ ;
 R⁴ se selecciona entre H y OR⁵;

15 R⁵ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6;
 como hapteno (de ahora en adelante, hapteno de la invención).

En una realización particular, se usa como hapteno al menos un compuesto de fórmula I, donde:

- 20 R¹ se selecciona entre H y C₁₋₄ alquilo,
 R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,
 R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,
 R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,
 R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,

25 m es un número entero seleccionado entre 0 y 6,

con la condición de que dicho compuesto no es un compuesto de fórmula general I de los siguientes:

I-a. donde R¹ es H, R² es COOH y R³ es H; o

I-b. donde R¹ es seleccionado entre H y alquilo C₁₋₂, R² es seleccionado entre (CH₂)₁₋₃-COOH y (CH₂)₁₋₃-COOCH₃ y R³ es H; o

- 30 **I-c.** donde R¹ es seleccionado entre H y alquilo C₁₋₂, R² es H y R³ es seleccionado entre (CH₂)₁₋₃-COOH y (CH₂)₁₋₃-COOCH₃.

Y en una realización más preferida de la anterior, además de dicho compuesto de fórmula I, comprende al menos un segundo compuesto de fórmula I donde:

- 35 R¹ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,
 R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,
 R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,
 R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,
 R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,
 40 m es un número entero seleccionado entre 0 y 6,

En una realización particular de cualquiera de las anteriores, en el compuesto utilizado como hapteno, R¹ es H.

- 45 En otra realización particular de cualquiera de las anteriores, en el compuesto utilizado como hapteno, R² es H y R³ es COOH.

En otra realización particular de cualquiera de las anteriores, en el compuesto utilizado como hapteno R² es COOH y R³ es H.

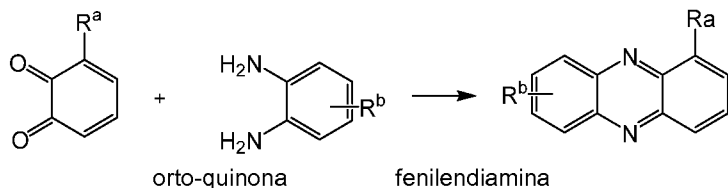
En una realización preferente este hapteno es el ácido 9-hidroxifenazina-2-carboxílico.

En otra realización preferente este hapteno es el ácido 6-hidroxi-fenazina-2-carboxílico.

En una realización más preferente de cualquiera de las anteriores, es una mezcla de haptenos. En una realización aun más preferente la mezcla de haptenos comprende el ácido 9-hidroxi-fenazina-2-carboxílico y el ácido 6-hidroxi-fenazina-2-carboxílico. En lo sucesivo, esta mezcla de haptenos se denomina "mezcla de haptenos PC1"

Método de síntesis del hapteno de la invención

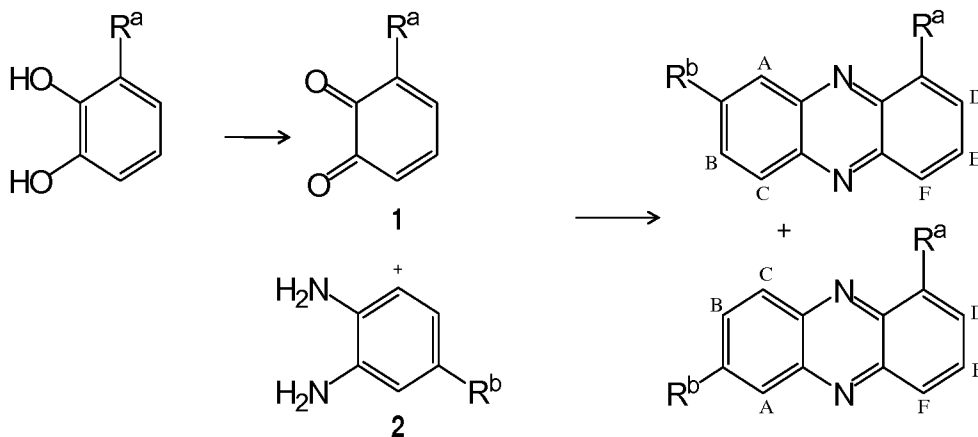
Los haptenos de fórmula general I pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica, en particular pueden sintetizarse a partir de la condensación de una orto-quinona con una fenilendiamina, mediante el siguiente procedimiento sintético:



donde R^a se selecciona del grupo que consiste en: $-OH$, $-O-C_{1-4}$ alquilo; R^b es $-(CH_2)_mCOR^4$, donde m es un entero entre 0 y 6, R^4 se selecciona entre $-H$ y $-OR^5$, y donde R^5 se selecciona entre $-H$ y $-C_{1-4}$ alquilo.

En una realización preferente la síntesis de la mezcla de haptenos PC1, tiene lugar siguiendo el siguiente esquema:

En una primera etapa se produce una condensación del 3,4-diaminobenzoato 2 con la benzoquinona 1



para obtener los correspondientes derivados de fenazina. La benzoquinona 1 se puede obtener por distintos métodos, como por ejemplo mediante la oxidación con o-cloranil del 3-metoxicatecol. La condensación de 1 y 2 produce el alcoxifenazinilcarboxilato de alquilo 3, como una mezcla de isómeros de posición. En una etapa posterior, se produce una desalquilación del éter aromático, utilizando, por ejemplo tribromuro de boro y obtener la mezcla de compuestos 4. A continuación, se hidroliza el éster alquílico en medio alcalino, para obtener la mezcla de haptenos PC1 (5).

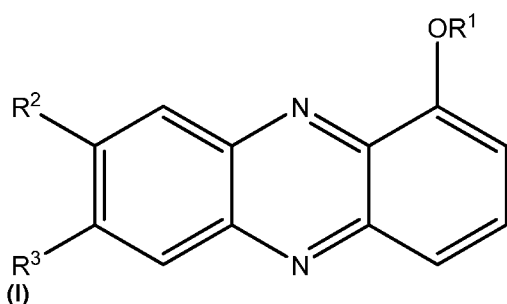
En una realización particular de la invención, los compuestos de los cuales derivan el hapteno o la mezcla de haptenos de fórmula I de la invención se seleccionan del grupo formado por la piocianina y la 1-hidroxi-fenazina.

En una realización preferida, la síntesis del hapteno PC1, es decir, la mezcla del ácido 9-hidroxi-fenazina-2-carboxílico y el ácido 6-hidroxi-fenazina-2-carboxílico, conserva como epitopos los anillos de fenazina y, de acuerdo a la invención, y tal como se explicará a continuación, se emplea en la generación de anticuerpos específicos de 1-hidroxi-fenazina.

Conjugado de la invención

Los autores de la presente invención, han obtenido conjugados de los haptenos de la invención con proteínas transportadoras, con agentes de marcaje o con polímeros o soportes inorgánicos.

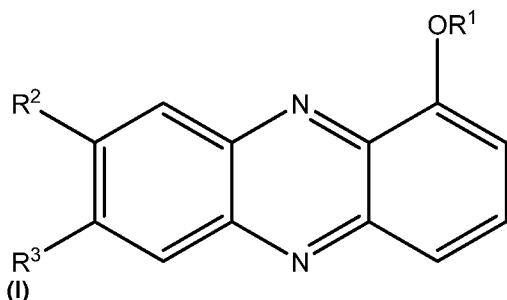
Por tanto, otro aspecto de la invención es un conjugado que comprende al menos un hapteno de fórmula I,



donde:

- 5 R¹ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,
 R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,
 R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,
 R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,
 R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄, y
 10 m es un número entero seleccionado entre 0 y 6;
 y un segundo componente que es una proteína transportadora o un fragmento de la misma que confiere
 antigenicidad.

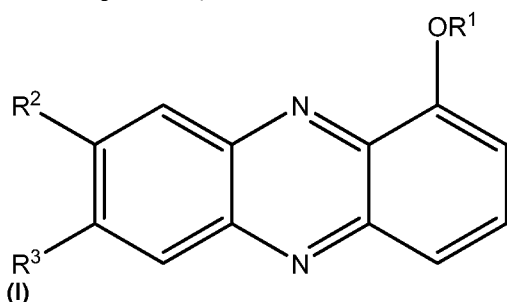
En una realización particular, es un conjugado que comprende al menos un hapteno de fórmula I,



donde:

- 15 R¹ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,
 R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,
 R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,
 20 R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,
 R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄, y
 m es un número entero seleccionado entre 0 y 6;
 con la condición de que dicho compuesto no es un compuesto de fórmula general I de los siguientes:
 25 I-a. donde R¹ es H, R² es COOH y R³ es H; o
 I-b. donde R¹ es seleccionado entre H y alquilo C₁₋₂, R² es seleccionado entre (CH₂)₁₋₃-COOH y (CH₂)₁₋₃-
 COOCH₃ y R³ es H; o
 I-c. donde R¹ es seleccionado entre H y alquilo C₁₋₂, R² es H y R³ es seleccionado entre (CH₂)₁₋₃-COOH y
 (CH₂)₁₋₃-COOCH₃,
 30 y un segundo componente que es una proteína transportadora, o un fragmento de la misma, que confiere
 antigenicidad.

Y en una realización particular más preferida de la anterior, además de dicho hapteno de fórmula general I, comprende un segundo hapteno de fórmula I,

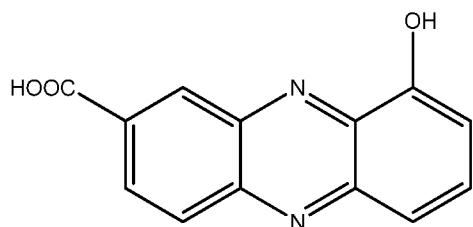


donde:

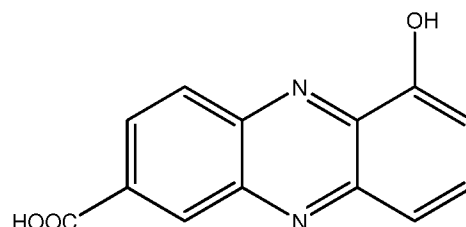
- 35 R¹ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,
 R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,
 R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,

R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,
 R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄, y
 m es un número entero seleccionado entre 0 y 6.

5 En una realización particular, en el conjugado como cualquiera de los definidos anteriormente en este aspecto de la invención, el hapteno de fórmula I comprende una mezcla de ácido 9-hidroxifenazina-2-carboxílico (II) y de ácido 6-hidroxifenazina-2-carboxílico (III).



10 ácido 9-hidroxifenazina-2-carboxílico
(II)



10 ácido 6-hidroxifenazina-2-carboxílico
(III)

En una realización particular de cualquiera de las anteriores, el segundo componente es una proteína transportadora, o un fragmento de la misma, que confiere antigenicidad, o un polímero o un soporte.

15 En otra realización particular de cualquiera de las anteriores, el conjugado según la invención tiene carácter inmunógeno, es decir, induce la formación de anticuerpos. Así, el conjugado de la invención comprende un hapteno tal como se ha descrito anteriormente y una proteína portadora, en donde dicha proteína portadora es responsable del carácter inmunógeno del conjugado de la invención. Es conocido por el experto en la materia que la intensidad de la respuesta de un sujeto a un inmunógeno viene dada por factores tales como el tamaño del
 20 inmunógeno, sus características químicas, y su diferencia con respecto a las proteínas propias del sujeto en el que se produce la inmunización. En general, los inmunógenos tienen un peso molecular mayor a 5 kDa, y su procedencia filogenética es lejana con respecto a la del sujeto en el que se produce la inmunización.

25 El proceso de inmunización frente al conjugado de la invención requiere que dicho conjugado se encuentre altamente purificado. La respuesta frente a un inmunógeno aumenta conforme se produce la exposición repetida a dicho inmunógeno, o bien el inmunógeno se administra en combinación con un adyuvante adecuado.

30 La proteína portadora del conjugado según la invención es una proteína que, conjugada al hapteno según la invención, confiere inmunogenicidad a dicho hapteno. Métodos para determinar que un conjugado es inmunogénico son conocidos por el experto en la materia, y comprenden, sin quedar limitados a, la determinación de la generación de anticuerpos específicos frente a dicho inmunógeno mediante técnicas tales como ELISA, western blotting, etc.

35 Proteínas portadoras preferidas según la invención son hemocianina de cangrejo herradura (HCH), seroalbúmina bovina (BSA), peroxidasa de rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA) y conalbúmina (CONA). En una realización particular de la invención, la proteína portadora que forma parte del conjugado de la invención se selecciona del grupo formado BSA y HCH.

40 La presente invención también contempla variantes de proteínas portadoras o fragmentos de éstas, con una similitud de al menos un 80%, 85%, 90%, 95% ó 99% respecto a la proteína portadora.

45 En una realización particular, el hapteno según la invención puede estar unido a un agente de marcaje, a modo de marcador para su detección, según se definieron previamente en la presente descripción. En una realización particular alternativa, el hapteno puede estar unido a un polímero o a un soporte, en particular a un polímero o a un soporte inorgánico, según se definen en el ámbito de la presente invención.

Método de obtención de los conjugados de la invención

50 Otro aspecto de la invención es un método para la obtención de un conjugado según la invención que consiste en someter el hapteno y el segundo componente del conjugado a un método de conjugación.

55 En los conjugados de la invención entre un hapteno y una proteína, las proteínas se unen al hapteno de forma covalente por medio de los aminoácidos accesibles en su superficie, preferiblemente aquellos aminoácidos con cadenas laterales de tipo nucleófilo. El aminoácido reactivo de las proteínas se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse a, cisteína, serina, tirosina y lisina; preferiblemente es lisina. Los procedimientos para lograr la conjugación de haptenos a otras moléculas portadoras dependen del grupo funcional presente en la molécula de hapteno en cuestión. También hay que tener en cuenta la estabilidad y la solubilidad del hapteno. Por lo tanto, dada la gran variedad de haptenos que existen, no hay un método común de conjugación.

En una realización de la presente invención, el hapteno de fórmula I de la invención se conjuga a la proteína transportadora a través del grupo R² o R³ de dicho hapteno, cuando R² o R³ es distinto de H.

5 Cuando el grupo R² o R³ del hapteno es un ácido carboxilo (-COOH), para la conjugación puede utilizarse, entre otros, el método del anhídrido mixto, el método de la carbodiimida (CDI) o el método del éster-N-hidroxisuccinimida (NHS) (este último también conocido como método del éster activo).

10 Cuando el grupo R² o R³ del hapteno es un aldehído (CHO), este puede ser transformado en grupo carboxilo mediante la formación de O-(carboximetil)oximas. La reacción se efectúa tratando el hapteno con O-(carboximetil)hidroxilamina. La reacción del ácido carboxílico formado con la proteína se continúa por uno de los métodos antes mencionados. Los haptenos que presentan grupos formilo también pueden ser acoplados directamente a través de la formación de las bases de Schiff, que son transformadas a aminas por reducción con borohidruro de sodio.

15 Todos estos métodos de conjugación son bien conocidos del estado de la técnica y se describen de modo resumido en Guerra *et al.* 2003 (Guerra M., Morris H. 2003. Revista Cubana de Química, vol. XV, nº 2) y de forma más extensa en Bartos *et al.* 1998 (Bartos E., Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Barcelona, 1988, págs. 279-296). Dichos métodos se muestran aquí a título orientativo y no en sentido limitativo, ya que pueden emplearse otros métodos de conjugación conocidos por el experto en la materia.

20 En una realización particular, cuando el hapteno de fórmula I es la mezcla de haptenos PC1, el procedimiento para la obtención del conjugado de estos haptenos con la proteína portadora comprende la activación del ácido carboxílico del hapteno y la reacción del hapteno activado con la proteína portadora.

25 En una realización particular, la activación del ácido carboxílico (R² o R³) se lleva a cabo mediante el método del anhídrido mixto, el método de la carbodiimida (CDI) o el método del éster N-hidroxisuccinimida (NHS).

En una realización particular, cuando el hapteno de fórmula I es la mezcla de haptenos PC1, éste se une a la proteína HCH o un fragmento de la misma mediante el método de conjugación del anhídrido mixto.

30 En una realización particular, cuando el hapteno de fórmula I es la mezcla de haptenos PC1, éste se une a la proteína BSA o un fragmento de la misma mediante el método de conjugación del anhídrido mixto o mediante el método de conjugación del éster N-hidroxisuccinimida.

35 En una realización particular del conjugado de la invención, el hapteno y la proteína portadora están unidos mediante un agente de entrecruzamiento.

40 Para el entrecruzamiento proteico, los grupos funcionales proteicos a los que se dirigen los agentes de entrecruzamiento comprenden grupos amino, grupos ε-amino de lisinas, grupos α-amino terminal, grupos sulfhidrilo (-SH o grupos tioles) de cisteínas, grupos carbohidrato (en el caso de glucoproteínas) y grupos carboxilo.

45 Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos amino, ε-amino de lisinas y α-amino terminal incluyen, sin limitarse a, imidoésteres y ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS-ésteres).

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos sulfhidrilo incluyen, sin limitarse a, maleimidias, haloacetilos (tales como iodoacetilo) y piridil disulfuro (piridilditioles).

50 Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos carbonilo (tales como aldehídos o cetonas) por tratamiento oxidativo de los carbohidratos de glucoproteínas incluyen, sin limitarse a, reactivos que comprenden hidrazidas (-NH-NH₂-).

Agentes de entrecruzamiento de proteínas a través de grupos carboxilo incluyen, sin limitarse a, carbodiimidias.

55 Como entiende el experto en la materia, la elección del agente de entrecruzamiento adecuado para la obtención de conjugados con carácter inmunógeno depende de los grupos funcionales presentes en el hapteno y la capacidad del conjugado hapteno-proteína portadora para actuar como inmunógeno. Dado que las proteínas portadoras habitualmente comprenden varios grupos carboxilo y amino primarios accesibles, un agente de entrecruzamiento habitual para la conjugación hapteno-proteína portadora es la carbodiimida, tal como EDC.

60 Todos estos métodos de conjugación también son útiles para la síntesis de conjugados entre un hapteno y un agente de marcaje. Los métodos utilizados para la conjugación entre un hapteno y un agente de marcaje son conocidos del estado de la técnica. Como el experto en la materia apreciará, para llevar a cabo esta reacción es necesario que el agente de marcaje posea un grupo funcional libre, preferiblemente un grupo funcional carboxilo, aldehído, halógeno, sulfhidrilo o amino.

65

La conjugación entre un hapteno de fórmula I y un polímero o un soporte puede realizarse utilizando los mismos procedimientos que para la conjugación a proteínas como los que se han definido aquí, ya sea directamente si tienen grupos funcionales libres o mediante una modificación de los mismos que introduzca un grupo funcional reactivo. Clásicamente, para los soportes inorgánicos, esto se ha realizado para óxido de silicio y de otros metales mediante silanos heterobifuncionales o mediante tioles funcionalizados (para superficies de metales nobles). Mientras que para los polímeros se utilizan directamente aquellos que ya poseen grupos funcionales activos procedentes de su formulación de base.

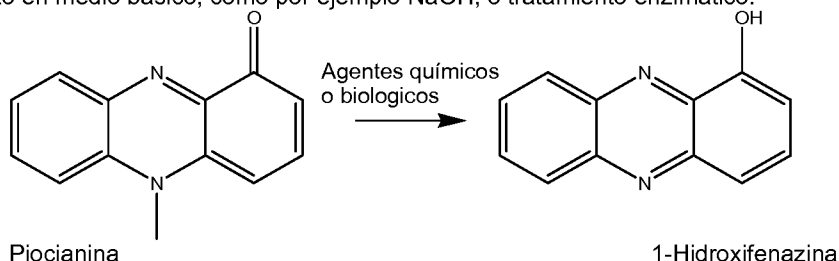
Anticuerpo que reconoce el conjugado de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un conjugado que comprende un hapteno de la invención de fórmula general I y una proteína transportadora que confiere antigenicidad para la obtención de anticuerpos.

Los autores de la presente invención han obtenido, mediante inmunización de animales con los conjugados de la invención, antiseros que comprenden anticuerpos policlonales específicos de dichos conjugados. Esto muestra que el conjugado de la invención, de carácter inmunógeno, puede ser empleado para la generación de una respuesta inmune, en la cual se generan anticuerpos específicos frente a dicho conjugado inmunógeno. Por otro lado, los autores de la presente invención han determinado que dichos anticuerpos generados de modo específico frente al conjugado de la invención son capaces de reconocer y unirse específicamente a derivados fenazínicos, en particular la 1-hidroxifenazina.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo (anticuerpo de la invención) que reconoce específicamente el conjugado de la invención. Puesto que el conjugado de la invención comprende un hapteno derivado de una fenazina, el anticuerpo de la invención, asimismo, reconoce específicamente agentes de tipo fenazínico de los cuales se deriva el hapteno del conjugado. Asimismo, la invención se relaciona con un antisuero que comprende al anticuerpo que reconoce y se une específicamente el conjugado de la invención. Adicionalmente, la invención se relaciona con el uso del anticuerpo o del antisuero que comprende dicho anticuerpo en la detección y/o cuantificación de 1-hidroxifenazina y/o piocianina en una muestra para la detección de infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

El anticuerpo no reconoce directamente la piocianina. La cuantificación de la piocianina presente en una muestra se realiza de forma indirecta tras una reacción de conversión de la piocianina en 1-hidroxifenazina mediante agentes químicos o biológicos adecuados y conocidos por un experto medio en la materia, como pueden ser tratamiento en medio básico, como por ejemplo NaOH, o tratamiento enzimático.



Para la generación de anticuerpos, el conjugado inmunógeno puede ser administrado formando parte de una composición inmunogénica que puede comprender además un soporte farmacéuticamente aceptable. Dicho soporte puede aumentar la inmunogenicidad del conjugado o inducir títulos mayores de anticuerpos. Soportes útiles incluyen soportes poliméricos, que pueden ser naturales (por ejemplo, polisacáridos, polipéptidos o proteínas de bacterias o virus), materiales semisintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales a los que se pueden unir un grupo reactivo. También se pueden usar como soportes productos bacterianos y proteínas víricas (por ejemplo, antígeno de superficie y antígeno central del virus de la hepatitis B), así como proteínas de organismos superiores tal como hemocianina de lapa californiana, hemocianina de cangrejo bayoneta, edestina, seroalbúminas de mamífero e inmunoglobulinas de mamífero. Productos bacterianos adicionales para uso como soportes incluyen proteínas de la pared bacteriana y otros productos (por ejemplo, paredes celulares y lipopolisacárido (LPS) de estreptococos y estafilococos).

La composición inmunogénica que comprende el conjugado de la invención para la generación de anticuerpos se puede administrar por cualquier medio que conozca el experto en la materia, tal como mediante inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa, y administración oral, nasal o anal. Véase, Banga A, "Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins", en Therapeutic Peptides and Proteins (Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, EE UU, 1995). Se ha mostrado que un soporte particulado basado en un polímero sintético actúa como adyuvante para aumentar la respuesta inmune, además de proporcionar una liberación controlada. También se pueden usar sales de aluminio como adyuvantes para producir una respuesta inmune.

El anticuerpo de la invención incluye, sin quedar limitado a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab y Fv de cadena sencilla (scFv) de los mismos, anticuerpos biespecíficos, heteroconjugados, anticuerpos humanos y humanizados. Tales anticuerpos pueden producirse en una variedad de modos, incluyendo cultivos de hibridoma, expresión recombinante en cultivos de células de mamífero o bacterias y expresión recombinante en animales transgénicos. También pueden producirse anticuerpos seleccionando una secuencia de una biblioteca de secuencias expresadas en sistemas de presentación tales como fagos filamentosos, bacterias, levaduras o ribosomas. Existe una orientación abundante en la bibliografía para seleccionar una metodología de producción particular, por ejemplo, Chadd y Chamow, Curr. Opin. Biotechnol., 12:188-194 (2001). La elección de la metodología de fabricación depende de varios factores que incluyen la estructura de anticuerpo deseada, la importancia de restos de hidratos de carbono en los anticuerpos, la facilidad de cultivo y purificación, y los costes. Pueden generarse muchas estructuras de anticuerpos diferentes usando tecnología de expresión convencional, incluyendo anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y Fv, así como anticuerpos quiméricos que comprenden componentes de especies diferentes. Fragmentos de anticuerpo de tamaño pequeño, tales como fragmentos Fab y Fv, que no tienen funciones efectoras y que tienen actividad farmacocinética limitada pueden generarse en un sistema de expresión bacteriano. Fragmentos Fv de cadena sencilla muestran baja inmunogenicidad y se eliminan rápidamente de la sangre.

En una realización preferida los anticuerpos son anticuerpos policlonales. Para la obtención de anticuerpos policlonales contra un hapteno de fórmula I se inmuniza un animal no humano con un conjugado de la invención que comprende dicho hapteno y una molécula transportadora que confiere antigenicidad según métodos conocidos por el experto en la técnica. Una vez obtenido un título de anticuerpos aceptable, el animal es exanguinado y se recoge el antisero que contiene los anticuerpos séricos formados por dicho animal.

En otra realización los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. El procedimiento de obtención de los anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse según métodos convencionales, conocidos en el estado de la técnica. Básicamente, el método consiste en inmunizar un animal con un conjugado según la invención que comprende un hapteno de fórmula (I) y una molécula transportadora que confiere inmunogenicidad, y posteriormente extraer células del bazo del animal inmunizado, que se fusionan con células de mieloma en presencia de un inductor de la fusión, tal como PEG-1500 por procedimientos estándar (Harlow D y Lane D. Antibodies: a laboratory manual. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York). Los hibridomas se seleccionan y se subclonan por dilución. Los clones aptos para su expansión se constituyen en una línea celular de hibridoma. A continuación, dicha línea celular de hibridoma se cultiva en un medio de cultivo adecuado para que las células de hibridoma produzcan anticuerpos y los secreten al medio, y se recoge posteriormente el sobrenadante del medio de cultivo que contiene los anticuerpos monoclonales producidos. Opcionalmente, dichos anticuerpos pueden purificarse por medios convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína A-Sepharosa, cromatografía con hidroxipatito, electroforesis en gel o diálisis. Por lo tanto, en una realización de la invención la obtención de anticuerpos comprende la administración de un conjugado según la invención y la recolección de células tisulares de dicho animal capaces de producir dichos anticuerpos.

El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de la invención pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos de manera que, aunque se altera la secuencia primaria del polipéptido, se mantenga la capacidad del anticuerpo de unirse al conjugado de la invención. Dicha sustitución puede ser una sustitución conservativa y, en general, se aplica para indicar que la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades similares (por ejemplo, la sustitución del ácido glutámico (aminoácido cargado) por el ácido aspártico sería una sustitución de aminoácidos conservativa).

También se contempla que el anticuerpo de la invención puede estar marcado con una etiqueta detectable o agente de marcaje que permita su localización y/o identificación, mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Así, en una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende un agente de marcaje.

Así, en una realización particular, el anticuerpo de la invención está modificado de forma covalentemente para que sea posible su posterior detección. En principio, la invención contempla el uso de cualquier marcador siempre que sea posible la conjugación covalente al anticuerpo y que permita la posterior detección de dicho anticuerpo. Así, la invención contempla la posibilidad de modificar el anticuerpo con un radioisótopo del tipo de ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At o ^{213}B . El marcaje con radioisótopos se lleva a cabo típicamente mediante el uso de ligandos quelantes que son capaces de acomplejar iones metálicos tales como DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, Tex.).

En una realización particular alternativa, el anticuerpo de la invención se marca con un grupo fluorescente. El grupo fluorescente puede unirse a las cadenas laterales de los aminoácidos directamente o bien a través de un grupo conector. Métodos para conjugar reactivos fluorescentes a polipéptidos son bien conocidos del estado de la técnica y han sido descritos, por ejemplo, en Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals,

Los reactivos adecuados para el marcaje de polipéptidos, tales como anticuerpos, con grupos fluorescentes incluyen grupos químicos que muestren capacidad para reaccionar con los distintos grupos que aparecen en las cadenas laterales de las proteínas, incluyendo, grupos amino y grupos tiol. Así, grupos químicos que pueden ser usados para modificar los anticuerpos de acuerdo a la presente invención incluyen, sin limitación, maleimida, haloacetil, iodoacetamida éster succinimidil (por ejemplo, NHS, N-hidroxisuccinimida), isotiocianato, sulfonil cloruro, 2,6-diclorotriazinil, éster pentafluorofenil, fosforamidita y similares. Un ejemplo de grupo funcional reactivo adecuado es el éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) de un grupo detectable modificado con un grupo carboxilo. Típicamente, el grupo carboxilo que modifica el compuesto fluorescente se activa mediante la puesta en contacto de dicho compuesto con un reactivo de carbodiimida (por ejemplo, dicitclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio tal como el TSTU (O--(N-Succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato), HBTU ((O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato), o HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato), un activador del tipo de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-hidroxisuccinimida para dar lugar al éster NHS del marcador.

Compuestos fluorescentes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, bromuro de etidio, SYBR Green, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiol tetrametil rodamina (TRIT), 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína, HEX (6-carboxi-2',4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Joe (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, 5-carboxi-rodamina, rodamina, tetrametilrodamina (Tamra), Rox (carboxi-X-rodamina), R6G (rodamina 6G), ftalocianinas, azometazinas, cianinas (Cy2, Cy3 y Cy5), Texas Red, Princeton Red, BODIPY FL-Br2, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, DABCYL, Eosina, Eritrosina, bromuro de etidio, proteína verde fluorescente (GFP) y sus análogos, marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (Quantum dot), marcadores fluorescentes basados en lantánidos tales como Eu³⁺ y Sm³⁺ y similares.

En una realización particular alternativa, los anticuerpos se marcan mediante conjugación con un primer miembro de un par de unión. En una forma preferida, dicha modificación covalente es una biotilación. El término "biotilación", según se usa en la presente invención, se refiere a la unión covalente de biotina a una molécula (típicamente una proteína). La biotilación se lleva a cabo usando reactivos capaces de conjugar biotina a la cadena lateral de las proteínas, en donde dicha conjugación tiene lugar fundamentalmente en los grupos amino primarios y en los grupos tioles que aparecen en las cadenas laterales de las proteínas. Reactivos adecuados para la biotilación de grupos amino incluyen moléculas que contienen biotina y un grupo capaz de reaccionar con grupos amino tales como ésteres de succinimida, éster de pentafluorofenil o haluros de alquilo, estando el grupo biotina y el grupo reactivo separados por un espaciador de cualquier longitud (por ejemplo, de 8-40 Å de longitud). Algunos ejemplos de estos agentes de biotilación incluyen agentes NHS-biotina (que contiene un enlace éster de cinco átomos de carbono entre la biotina y el grupo NHS), sulfo-NHS-biotina, NHS-LC-biotina, sulfo-NHS-LC-biotina, NHS-LC-LC-biotina, sulfo-NHS-LC-LC-biotina, sulfo-NHS-SS-biotina, NHS-PEO4-biotina, PFP-biotina, TFP-PEO-biotina y similares, en donde "NHS" indica un grupo N-hidroxisuccinimida, "LC" se refiere a un enlace tipo amida de 6 átomos de carbono localizado entre el grupo NHS y la biotina, "PEO" se refiere a un grupo etilenoóxido, en donde el subíndice indica el número de unidades PEO, "PFP" se refiere a un grupo pentafluorofenilo "TFP" se refiere a un grupo tetrafluorofenilo, "sulfo" se refiere a un grupo sulfonato (SO₃⁻ Na⁺) and "SS" se refiere a un grupo disulfuro. Ejemplos de agentes de biotilación reactivos con grupos tiol incluyen moléculas que comprenden biotina y un grupo del tipo maleimido o alquil haluro, separados por un espaciador de cualquier longitud. Ejemplos de reactivos de biotilación incluyen maleimide-PEG-biotina, biotina-BMCC (que contiene un grupo maleimido N-terminal y un grupo ciclohexil, 2 enlaces amida y 9 átomos de carbono enlazadores), PEO-iodoacetil biotina, iodoacetil-LC-biotina, biotina-HPDP (que contiene un grupo piridilo disulfuro) y similares.

Uso del anticuerpo de la invención

El anticuerpo de la invención puede ser utilizado en la determinación y/o cuantificación de fenazinas generadas cuando un sujeto sufre una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, en particular piocianina y/o 1-hidroxifenazina y sus derivados en una muestra de un sujeto.

El uso del anticuerpo de la invención puede llevarse a cabo en cualquier tipo de técnica inmunoquímica de análisis dirigida a la detección, determinación y/o cuantificación, o extracción selectiva de fenazinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*. Tales técnicas inmunoquímicas de análisis comprenden, sin limitarse a, ELISA, inmunosorbentes, cromatografía de inmunoafinidad, ensayos de tira o de flujo lateral (lateral-flow immunoassay), inmunosensores, inmunoprecipitación, Western blot, dot-blot, radioinmunoensayo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y citometría de flujo.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo (uso del anticuerpo de la invención) que reconoce específicamente el conjugado de la invención en la detección y/o cuantificación de piocianina y/o 1-hidroxifenazina en una muestra obtenida previamente de un sujeto.

En una realización preferida, la muestra del sujeto es una muestra de sangre, orina o esputo. En una realización aún más preferida, la muestra en la que se detecta infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*, a través de la determinación de la presencia de fenazinas es una muestra de esputo.

5 Método para la detección y/o cuantificación de piocianina y/o 1-hidroxifenazina

Los inventores han desarrollado un método que permite detectar y/o cuantificar las fenazinas de la invención, en particular la 1-hidroxifenazina y/o la piocianina, en cualquier tipo de muestra mediante el uso de los anticuerpos y conjugados de la invención.

10 Por tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de la 1-hidroxifenazina y/o la piocianina en una muestra que comprende el uso de un anticuerpo según la invención o de un fragmento del mismo con capacidad de unión al antígeno o un antisuero que comprende el anticuerpo anterior. En el método anterior, dicho uso del anticuerpo comprende al menos las siguientes etapas:

15 poner en contacto la muestra a analizar con el anticuerpo de la invención durante el tiempo necesario para su unión (incubación),

20 identificar la formación de los inmunocomplejos formados con dicho anticuerpo y/o medir la cantidad de dichos inmunocomplejos.

Opcionalmente, cuando el método de la invención comprende la detección y/o cuantificación de piocianina, comprende además una etapa previa de tratamiento de la muestra que consiste en la conversión de la piocianina en 1-hidroxifenazina mediante agentes químicos o biológicos adecuados y conocidos por un experto medio en la materia, como pueden ser tratamiento en medio básico como por ejemplo NaOH, o tratamiento enzimático.

Adicionalmente, dicho método en cualquiera de sus variantes anteriores puede requerir también un conjugado según la invención. En una realización particular, además del anticuerpo de la invención se utiliza un conjugado que comprende un hapteno de fórmula I y un segundo componente que puede ser una proteína transportadora que confiere antigenicidad o un agente de marcaje detectable.

El método de la invención permite no sólo detectar la presencia de 1-hidroxifenazina y/o la piocianina en una muestra, sino también valorar la concentración de dichas fenazinas presentes en dicha muestra.

35 El método de la presente invención permite analizar el contenido de fenazinas, en particular 1-hidroxifenazina y/o la piocianina, en diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de cultivos celulares, muestras medioambientales tales como agua, suelo o superficie, y muestras biológicas tales como supuraciones del oído, exudados dermatológicos de quemados o heridas, esputo, lavados bronquiales, saliva, sangre u orina. En una realización particular del método *in vitro* de detección y/o cuantificación de fenazinas, la muestra procede de un sujeto susceptible de tener una infección provocada por *Pseudomonas aeruginosa*. En una realización preferida, la muestra es esputo. En otra realización preferida, la muestra es plasma.

En general, la muestra de ensayo se obtendrá por métodos convencionales, conocidos por los técnicos en la materia, dependiendo de la naturaleza de la muestra. Antes de iniciar el ensayo, la muestra puede ser sometida (o no) a un tratamiento previo, precipitada, fraccionada, separada, diluida, concentrada o purificada.

Se puede usar cualquiera de una amplia variedad de formatos inmunoquímicos de análisis según el método de la presente invención. Tales técnicas inmunoquímicas de análisis comprenden, sin limitarse a, ELISA, inmunoensayo de tira o LFIA, inmunosensores, sistemas de extracción por inmovilización, inmunoprecipitación, transferencia Western o Western blotting, dot blot, radioinmunoensayo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y citometría de flujo. Tales formatos pueden ser heterogéneos u homogéneos, secuenciales o simultáneos, competitivos o no competitivos.

Las técnicas de inmunoensayo heterogéneo implican típicamente el uso de un material de fase sólida al que se une el producto de reacción, pero se puede adaptar para implicar la unión de antígenos y anticuerpos no inmovilizados (es decir, un inmunoensayo en fase solución). El producto de reacción se separa del exceso de muestra, reactivos del ensayo y otras sustancias eliminando la fase sólida de la mezcla de reacción (por ejemplo, mediante lavados).

En una realización preferida del método de detección y/o cuantificación de las fenazinas de la invención, en particular 1-hidroxifenazina y/o piocianina, la detección y/o cuantificación se realiza mediante un ensayo de tipo ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, del inglés "*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*"). Este ensayo se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (e.g., un antígeno o un anticuerpo) se inmoviliza sobre un soporte sólido, y, a continuación, ese sistema se pone en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede estar unido a un compuesto marcador. Así, en una realización particular, el conjugado que comprende un antígeno derivado de una fenazina de la invención se inmoviliza sobre el soporte sólido, y este sistema se pone en contacto con una muestra susceptible de contener anticuerpos anti-fenazinas. En particular, el conjugado que se inmoviliza sobre el

soporte es el conjugado que comprende PC1. En una realización particular alternativa, el anticuerpo de la invención se inmoviliza sobre el soporte sólido, y este sistema se pone en contacto con la muestra susceptible de contener compuestos de tipos fenazínico.

5 Son conocidos diferentes tipos de ELISA, tales como el ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA tipo sándwich, de carácter competitivo o no competitivo.

10 En el ELISA competitivo directo, el soporte sólido sobre el que se realiza el ensayo se prepara recubriendo la superficie de dicho soporte con el anticuerpo específico. Tras una etapa de lavado se añade la muestra en la que se sospecha se encuentra la fenazina o fenazinas de interés (o analito), y se incuba junto con el marcador enzimático unido al hapteno como competidor. Este tipo de ensayo es indicativo de la presencia de analito en la muestra analizada. Se incluyen muestras del mismo tipo a la muestra problema analizada, pero carentes del analito de interés, como controles negativos. Asimismo se incluyen controles positivos, o muestras en las que se encuentra presente el analito de interés.

15 En el ELISA competitivo indirecto, el soporte se prepara de la misma forma anterior pero esta vez inmovilizando el antígeno de interés. Tras la incubación y correspondiente lavado se añade la muestra a analizar y el anticuerpo específico. Se incluyen también controles positivos y negativos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario que reconoce al primario y que está marcado. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. En este tipo de ensayo, un mismo anticuerpo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran variedad de antígenos.

20 En el ELISA no competitivo de antígeno de tapizado, se inmoviliza sobre el soporte sólido el antígeno, en particular un conjugado según la invención, añadiéndose a continuación un primer anticuerpo que reconoce y se une al antígeno inmovilizado. En el caso del ELISA no competitivo directo el primer anticuerpo puede estar directamente conjugado a un agente de marcaje detectable. O bien en el caso del ELISA no competitivo indirecto puede añadirse un segundo anticuerpo marcado que reconoce el primer anticuerpo. En una realización particular de la invención, este ensayo permite evaluar el título de anticuerpos generado en un animal no humano inmunizado midiendo la unión de diluciones seriadas de cada antisuero a placas de microtitulación tapizadas previamente con un conjugado según la invención, así como el rastreo de los diferentes anticuerpos obtenidos y los antígenos producidos. En una realización preferida de la invención, el conjugado utilizado es el que comprende un hapteno de fórmula I y BSA como proteína portadora.

25 Son métodos incluidos en la presente invención, aquellos ensayos ELISA en los que el conjugado de la invención está anclado al soporte, así como aquellos ensayos ELISA en los que lo anclado al soporte es el anticuerpo de la invención.

En una realización de la invención, el inmunoensayo es un ELISA competitivo indirecto que comprende:

- 40 (a) inmovilizar en un soporte sólido un conjugado que comprende un hapteno de fórmula I y una proteína o bien un conjugado que comprende un hapteno de fórmula I y un polímero,
- (b) eliminar el conjugado no inmovilizado,
- (c) añadir la muestra a analizar y un primer anticuerpo anti-fenazinas obtenido al inmunizar un animal con un conjugado que comprende un hapteno de fórmula I, o bien un antisuero que contiene el anticuerpo, y una proteína transportadora que confiere antigenicidad en el soporte sólido del apartado (a) e incubar,
- 45 (d) eliminar el primer anticuerpo no unido al conjugado,
- (e) añadir un segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable, reconociendo dicho segundo anticuerpo al primer anticuerpo e incubar,
- (f) eliminar el segundo anticuerpo no unido al primer anticuerpo, y
- 50 (g) identificar y/o medir la cantidad de complejo obtenido según el apartado (e) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

En la primera etapa del método de la invención [etapa (a)] se inmoviliza sobre un soporte sólido un conjugado que comprende un hapteno de fórmula I y una proteína transportadora o bien un conjugado que comprende un hapteno de fórmula I y un polímero. Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de soportes sólidos en las técnicas inmunoquímicas de la presente invención tal y como se han descrito anteriormente. En el contexto de la presente realización el soporte sólido son placas para el análisis ELISA. La inmovilización del conjugado en la superficie de un soporte como el plástico de poliestireno está dirigida por la química de la superficie. La capacidad de inmovilización de los conjugados, que en este caso actúan como antígenos competidores, depende de muchos factores, tales como el tiempo y la temperatura. La etapa de inmovilización del conjugado puede incluir el bloqueo de los espacios del soporte que no hayan sido ocupados por dichos conjugados. El bloqueo se lleva a cabo mediante proteínas o detergentes, preferiblemente detergentes no iónicos. Con el fin de disminuir las interacciones inespecíficas, el conjugado que se inmoviliza debe comprender una proteína diferente a la empleada en el conjugado utilizado como inmunógeno. En una realización preferida el conjugado inmovilizado en esta etapa comprende un hapteno de fórmula I y una proteína transportadora, preferiblemente BSA.

65

Los componentes pueden encontrarse inmovilizados al soporte mediante enlaces covalentes o mediante enlaces no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o enlaces iónicos. Una revisión general de micromatrices y de soportes adecuados se ha descrito en Shalon et al. (Genome Research 6: 639-645 (1996), LeGendre (BioTechniques 9: 788-805 (1990), US6197599 y US6140045. Alternativamente, es posible usar soportes activados mediante grupos epoxi, grupos vinil sulfónico, grupos éster activos, grupos aldehído, grupos carboxilo, grupos amino, grupos tiol, grupos isotiocianato y similares. En el caso de que el soporte se encuentre activado mediante grupos epoxi, estos grupos incluyen 3-glisidoxi propil trimetoxi silano (GTMS), 2-(3,4 epoxi ciclohexil)etil trimetoxi silano, 3-glisidoxi propil metil dietoxi silano, 3-glisidoxi propil trietoxi silano y similares.

La etapa (b) del método consiste en eliminar el conjugado no inmovilizado. Típicamente, esto se lleva a cabo mediante lavados, habitualmente entre 1 y 10 lavados, preferiblemente de 2 a 5 lavados. Los lavados tienen la finalidad de eliminar los conjugados que no se hayan inmovilizado, de forma que todo aquello que sea detectado sea específico y deseado.

La tercera etapa del método de la invención [etapa (c)] consiste en añadir la muestra a analizar susceptible de contener el analito que se quiere detectar y/o cuantificar y un primer anticuerpo anti-fenazina según la invención en el soporte sólido del apartado (a) e incubar. Esta etapa es la etapa competitiva del ensayo. Por "primer anticuerpo anti-fenazina" se entiende un anticuerpo según la invención, generado contra un conjugado que comprende un hapteno de fórmula general I y una molécula transportadora que confiere antigenicidad, preferiblemente frente a un conjugado que comprende la mezcla de haptenos PC1 y la proteína transportadora HCH. La 1-hidroxifenazina presente en la muestra a analizar y el conjugado inmovilizado en el soporte sólido de la etapa (a) competirán por la unión del primer anticuerpo anti-fenazina. Como el experto en la técnica entenderá, el hapteno del conjugado inmovilizado de la etapa (a) y el hapteno del conjugado utilizado para la obtención de los anticuerpos de la etapa (c) debe ser el mismo. Sin embargo, el segundo componente de ambos conjugados, la proteína transportadora, puede variar.

La etapa (c) es la etapa crucial del ensayo. En una realización preferida la etapa (c) tiene una duración comprendida entre 10 minutos y 1 hora, preferiblemente 30 minutos. La agitación durante esta etapa favorece la unión de los anticuerpos. Por eso en una realización preferida la etapa (c) se realiza en agitación.

Este ensayo ha demostrado tolerar un amplio rango de fuerzas iónicas y valores de pH. Los inventores han optimizado el tampón utilizado en la etapa competitiva del ensayo [etapa (c)]. En una realización de la invención la etapa (c) se realiza en presencia de un tampón que tiene las siguientes características:

1. una concentración de detergente no iónico entre 0% y 2% preferiblemente de 0,05%;
2. un pH comprendido entre 3 y 10, preferiblemente de 7,5;
3. una conductividad comprendida entre 5 y 70 mS/cm, preferiblemente de 14.5 mS/cm.

La cuarta etapa del método de la invención [etapa (d)] consiste en eliminar el primer anticuerpo no unido al conjugado inmovilizado. Típicamente, esto se realiza mediante lavados en las mismas condiciones que la etapa (b).

La siguiente etapa del método de la invención [etapa (e)] consiste en añadir un segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable, reconociendo dicho segundo anticuerpo al primer anticuerpo e incubar. Dicho segundo anticuerpo está conjugado con un compuesto capaz de reaccionar con algún sustrato, de forma que se derive de ello una detección cromogénica, fluorogénica y/o quimioluminiscente. Este compuesto puede unirse al anticuerpo directamente o a través de otro componente. El segundo anticuerpo puede ser una inmunoglobulina natural aislada de una especie no humana y diferente de la especie utilizada para producir el primer anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo murino anti-IgG, anticuerpo de cabra anti-IgG, anticuerpo de cabra anti-IgM) o se puede producir de forma recombinante o sintética. Puede ser una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina (por ejemplo, FAb, F[Ab]₂). Según se desee, se pueden emplear otras moléculas de unión junto con o en lugar de tales segundos anticuerpos. En una realización preferida, el segundo anticuerpo está conjugado con un enzima, preferiblemente peroxidasa, más preferiblemente HRP. Las condiciones adecuadas para que tenga lugar la unión del segundo anticuerpo al primer anticuerpo son conocidas por los expertos en la materia.

A continuación tiene lugar la etapa (f) que consiste en eliminar el segundo anticuerpo no unido al primer anticuerpo. Típicamente, esto se efectúa mediante un lavado en las mismas condiciones que en las etapas (b) y (d).

Finalmente, la última etapa (g) consiste en la identificación y/o medir la cantidad del complejo obtenido según el apartado (e) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente. Un sustrato indicador es una sustancia capaz de reaccionar con el agente de marcaje del segundo anticuerpo dando como resultado un compuesto cromóforo, fluorescente o quimioluminiscente que puede detectarse por métodos conocidos en el estado de la técnica. Sustratos indicadores adecuados para llevar a cabo la presente invención son conocidos por el experto en la materia y accesibles a partir de diversas fuentes comerciales. Preferiblemente, el sustrato indicador es cromogénico, como por ejemplo la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), el ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) o la fenilendiamina, sin limitación de utilizar otros sustratos como marcadores químicos (por ejemplo, marcadores de oro coloidal, bolas de látex). Cuando se emplean sustratos cromogénicos, la presencia de 1-hidroxifenazina en la muestra se evidencia por la aparición de un color cuya intensidad varía directamente con el número de moléculas unidas al primer anticuerpo anti-fenazina añadido en la

etapa (c) y su cuantificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de espectrofotometría. Si se emplea un sustrato fluorogénico la detección y cuantificación se realiza por medio de fluorimetría, y si el sustrato es quimioluminiscente, la señal se puede cuantificar por medio de un luminómetro.

5 En una realización particular de la invención, el marcador enzimático es peroxidasa de rábano (HRP), el sustrato es cromogénico y la reacción es enzimática. En este caso, la reacción es inhibida pasado un tiempo desde que se añadió el sustrato y para ello se cambian las condiciones óptimas de funcionamiento de la enzima que se esté utilizando.

10 En una realización preferida del método *in vitro* anterior, cuando la detección y/o cuantificación de fenazina comprende la detección de piocianina, previamente a la etapa (c) de puesta en contacto de la muestra con el anticuerpo anti-fenazina, dicho método comprende además una etapa (c') que consiste en la conversión de la piocianina en 1-hidroxifenazina mediante agentes químicos o biológicos adecuados y conocidos por un experto medio en la materia, como pueden ser tratamiento en medio básico como por ejemplo NaOH, o tratamiento enzimático.

15 En una realización particular, la muestra se divide en dos partes. Una fracción (A) se utilizará para cuantificar la cantidad de 1-hidroxifenazina presente inicialmente en la muestra, y se añadirá directamente en la etapa c) y la segunda fracción (B) se someterá a un tratamiento previo (etapa c') en el cual la piocianina se convierte en 1-hidroxifenazina. La cuantificación inmunoquímica de la fracción A nos dará el valor inicial de 1-hidroxifenazina presente en la muestra y la diferencia entre la fracción B y la fracción A corresponderá con la concentración piocianina en la muestra.

Kit para la detección y/o cuantificación de compuestos fenazínicos de la invención

25 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit para la detección y/o cuantificación de compuestos fenazínicos, en particular 1-hidroxifenazina y/o piocianina, en la muestra de un sujeto que comprende al menos un componente seleccionado del grupo formado por un anticuerpo según la invención, un antisuero que comprende un anticuerpo según la invención y un conjugado según la invención.

30 En una realización particular del kit según la invención, el anticuerpo o el conjugado está inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como se ha descrito anteriormente.

35 En una realización aún más preferida el kit comprende además un anticuerpo contra los anticuerpos anti-fenazina según la invención.

Todas las realizaciones particulares de los conjugados y anticuerpos de la presente invención son aplicables también a los kits de la invención.

40 Este tipo de dispositivos permiten realizar pruebas diagnósticas fuera de un laboratorio clínico y por parte de personal no especializado, de modo automatizado y miniaturizado, de modo no invasivo y con un rápido diagnóstico, a partir de muestras de pequeño volumen y fácil obtención.

45 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en ningún caso como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLOS

50 Los compuestos de fórmula I pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica, 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.

Material y métodos

A. Química

Métodos Generales e Instrumentación.

60 La cromatografía en capa fina se realizó en hojas de aluminio F254 de 0,25 mm precubiertas de gel de sílice 60 (Merck, Darmstadt, Alemania), y las separaciones de los diferentes compuestos sintetizados se realizó por cromatografía en columna de sílice con 60 A C.C. 35-70 μm dodecil sulfato de sodio. Los espectros NMR ^1H se obtuvieron con un Varian Inova-500 (Varian Inc., Palo Alto, CA) espectrómetro (500 MHz para ^1H). La masa exacta fue obtenida utilizando el sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Waters Acquity (UPLC) (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.), utilizando como detector espectrómetro de masas Waters LCT Premier XE tiempo de vuelo modo ESI(+). Se utilizó una columna UPLC Acquity C18 2.1 X 100 mm (7 μm ; Waters; Massachusetts, USA). Los análisis de HPLC-UV se llevaron a cabo utilizando la bomba LaChrom Elite L-2130 HTA con un detector de diodo array L-2455 y un muestreador automático L-2200 (Merck, Darmstadt, Germany). Los cromatogramas

fueron procesados con el software EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Alemania). Se utilizó una columna Lichrosphere 100 RP-18 Encaped 125 x 4 (5 μ m; Merck; Darmstadt, Germany). Los análisis se realizaron en modo gradiente y como fase móvil se utilizó el programa: min 0-2, ACN: tampón acuoso (0,3% NH₃, H₂O (ajustado a pH=9 con HCl)) 0:100; min 18, ACN: tampón acuoso 50:50, a un flujo de 1,0 mL min⁻¹.

1-Hidroxifenazina. La 1-hidroxifenazina se sintetizó siguiendo la síntesis descrita por Vivian (*Nature* **1956**, 178, 753). Se obtuvo un polvo de color amarillo con un rendimiento del 94%. ¹H-RMN (500MHz, CDCl₃); δ ppm: 7,20 (dd, 1H_{Ar}, J=1,5Hz, J=7,4Hz), 7,69 (dd, 1H_{Ar}, J=1,5Hz, J=8,7Hz), 7,78 (dd, 1H_{Ar}, J=7,2Hz, J=8,7Hz), 7,94 (m, 2H_{Ar}), 8,21 (m, 1H_{Ar}), 8,29 (m, 1H_{Ar}) UPLC ESI(+) calculado para C₁₂H₈N₂O (M+) 196,0637, encontrado 197,0696.

1-Hidroxifenazina a partir de piocianina

Se añadió una solución de NaOH 2 M (250 μ L) a un vial que contenía piocianina (10 mM, 25 μ L) en PBS 10mM (85 μ L), previamente dopados con fenazina (500 μ M, 140 μ L). El progreso de la reacción se monitorizó mediante la extracción de alícuotas (10 μ L) de la solución de reacción a varios intervalos de tiempo, diluyéndolas con PBS 250 mM (90 μ L) y añadiendo HCl 1 M (10 μ L) para neutralizar el pH.

Piocianina. La piocianina se obtuvo a partir de la 1-hidroxifenazina por la metilación selectiva del N5 a fin de obtener la toxina azul siguiendo el procedimiento ya descrito por Surrey (*Organic Syntheses Collective* **1955**, 3, 753-756) para obtener el compuesto deseado con 53% de rendimiento. UPLC ESI(+) calculado para C₁₃H₁₀N₂O (M+) 210,0793, encontrado 211,0862.

Síntesis del hapteno PC1.

Los haptenos de inmunización y competidores fueron sintetizados mediante el método sintético descrito por Surrey, citado anteriormente, con ligeras modificaciones.

Mezcla 1:3 de 9-metoxifenazina-2-carboxilato de metilo y 6-metoxifenazina-2-carboxilato de metilo (3)

El ácido 3,4-diaminobenzoico (2 g, 13,14 mmol) se convirtió a 3,4-diaminobenzoato de metilo **2** (2,04 g, 12,27 mmol, 94% rendimiento) utilizando cloruro de tionilo (1,24 mL, 17,1 mmol) con un reflujo de MeOH durante 11 h. En paralelo, una solución de 3-metoxicatecol (2 g, 14,27 mmol) se oxidó mediante la adición gota a gota de una solución de o-cloranil (3,65 g, 14,84 mmol) en Et₂O anhidro a -20°C durante 15 minutos para obtener mediante filtración el 3-metoxi-[1,2]benzoquinona **1** (1,56 g, 11,29 mmol, 79% rendimiento) como un sólido verde oscuro. El sólido se lavó con Et₂O y el residuo final obtenido (700 mg, 5,06 mmol) se redisolvió inmediatamente en CH₂Cl₂ (30 mL) y se añadió gota a gota a una solución del éster de metilo **2** (660 mg, 3,97 mmol) en el mismo disolvente (10 mL) ligeramente acidificada con ácido acético (5 gotas). Después de agitar durante 1,5 h a t.a., la solución se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (10 mL), se secó (Mg₂SO₄) y el disolvente se eliminó a vacío. El producto se purificó por cromatografía en sílice gel utilizando una fase móvil de 1:1 EtOAc:hexano para producir el compuesto deseado en forma de una mezcla de isómeros en forma de un sólido de color amarillo (110 mg, 41% rendimiento). May significa producto mayoritario y Min producto minoritario. ¹H-RMN (500MHz, CDCl₃); δ ppm: 4,03 (s, 6H, 1-COOCH₃ may, 1-COOCH₃ min), 4,18 (s, 6H, 1-OCH₃ may, 1-OCH₃ min), 7,07 (d, 1H_{Ar} min, J=6,59 Hz), 7,1 (d, 1H_{Ar} may, J=7,6 Hz), 7,73-7,86 (senal compleja, 4H, 2H_{Ar} min, 2H_{Ar} may), 8,36 (dd, 1H_{Ar} may, J=9,03 Hz, J=1,7 Hz), 8,38 (dd, 1H_{Ar} min, J=9,03 Hz, J=1,7 Hz), 8,42 (dd, 1H_{Ar} may, J=9,03 Hz, J=1,7 Hz), 8,95 (s, 1H_A may), 9,15 (s, 1H_A min).

Mezcla 1:4 de 9-hidroxifenazina-2-carboxilato de metilo y 6-hidroxifenazina-2-carboxilato de metilo (4)

Una solución de la mezcla 1:3 de los carboxilatos de metoxifenazina **3** (81 mg, 0,30 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (2 mL) se enfrió a -75°C y se añadió una solución de tribromuro de boro 1 M en CH₂Cl₂ (410 μ L, 0,41 mmol). Después de agitar durante 15 min, la mezcla de reacción se dejó llegar a temperatura ambiente y después se agitó durante 10 h más. Después, el matraz de reacción se sumergió en un baño de hielo (0°-4°C) y se añadió agua destilada gota a gota, hasta que el exceso de tribromuro de boro fue destruido. El residuo se extrajo después con CH₂Cl₂ (2 mL), se secó (Mg₂SO₄) y el disolvente se eliminó a vacío. La cromatografía sílice gel se empleó para purificar la mezcla de reacción produciendo la mezcla de isómeros deseada **4** como un sólido rojo / marrón (23 mg, 10% rendimiento). May significa producto mayoritario y Min producto minoritario. ¹H-RMN (500MHz, CDCl₃); δ ppm: 4,05 (s, 6H, 2-OCH₃ may, 2-OCH₃ min), 7,76-7,85 (sc, 2H_{D-F} may, 2H_{D-F} min), 8,23 (d, 1H_B may, J=9,0), 8,28 (d, 1H_B min, J=9,0Hz), 8,37 (dd, 1H_C may, J=9,03 Hz, J=1,71 Hz), 8,39 (dd, 1H_C min, J=9,03 Hz, J=1,71 Hz), 8,92 (s, 1H_A min), 8,98 (s, 1H_A may)

Mezcla 1:4 de ácido 9-hidroxifenazina-2-carboxílico y ácido 6-hidroxifenazina-2-carboxílico (5) (mezcla 1:4 haptenos-PC1)

La mezcla de 1:4 de carboxilatos hidroxifenazina **4** (20 mg, 78,7 mmol) se disolvió en una solución de KOH 0,5 M en THF (1mL) y se agitó durante 30 min a t.a. Después, el THF se eliminó por destilación y la parte acuosa se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (5 mL) y EtOAc (5 mL x 3 veces). La fase acuosa de color amarillo se acidificó a pH 3 con HCl 5 N y se extrajo con EtOAc (3 x 5 mL). Los extractos orgánicos combinados de EtOAc se

secaron sobre Mg_2SO_4 y el disolvente se eliminó a vacío hasta sequedad. El polvo naranja resultante se lavó con Et_2O (5 ml) y se filtró a través de una placa del filtro para dar una mezcla 1:4 del hapteno esperado **5** (13 mg, 97 % rendimiento) como una mezcla 1:4 de isómeros posicionales. May significa producto mayoritario y Min producto minoritario. 1H -RMN (500MHz, DMSO); δ ppm: 7,25 (d, $1H_{D \text{ min}}$, $J=7,84$ Hz), 7,27 (d, $1H_{D \text{ maj}}$), 7,73 (d, $1H_{F \text{ min}}$, $J=\text{solapada}$), 7,75 (d, $1H_{F \text{ may}}$, $J=8,33$), 7,84 (dd, $1H_{E \text{ may}}$, $J=7,48$ Hz, $J=8,76$ Hz), 7,87 (dd, $1H_{E \text{ min}}$, $J=7,42$ Hz, $J=8,88$ Hz), 8,28-8,33 (d, $1H_{C \text{ min}}$, $J=\text{solapada}$), 8,29 (dd, $1H_{B \text{ min}}$, $J=8,7$ Hz, $J=\text{solapada}$), 8,32 (dd, $1H_{B \text{ may}}$, $J=9,05$ Hz, $J=1,7$), 8,36 (d, $1H_{C \text{ may}}$, $J=9,09$ Hz), 8,77 (s, $1H_{A \text{ may}}$), 8,81 (s, $1H_{A \text{ min}}$). UPLC ESI(+) calculado para $C_{13}H_8N_2O_3$ (M+) 241,0613, encontrado 241,0606.

10 B. Inmunoquímica

Métodos Generales e Instrumentación.

El espectrómetro de masas MALDI-TOF-MS (espectrómetro de masas con láser asistido por matriz de ionización/desorción con tiempo de vuelo) que se utiliza para caracterizar los conjugados de proteínas era un Bruker 200-Hz SmartBeam (Bruker-Daltonics, Leipzig, Alemania). La detección se realizó en el modo de ión positivo, ionizada con un conjunto potencia del láser a 70% de la intensidad del láser máximo del instrumento a una frecuencia de 10-100 Hz. El pH y la conductividad de todos los tampones y soluciones se midieron con un pHmetro 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Las placas de microtitulación de poliestireno fueron de Nunc (Maxisorp, Roskilde, Dinamarca). Los pasos de lavado se llevaron a cabo utilizando un lavador de microplacas ELx405 HT (BioTek, Vinooski, Vermont, USA). Las absorbancias se leyeron en un SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) en un modo de longitud de onda de 450 nm. Las curvas de competición se analizaron con una ecuación de cuatro parámetros utilizando el software SoftmaxPro v4.7 (Molecular Devices) y GraphPad Prism v 4 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). La curva patrón se ajustó a una ecuación logística de cuatro parámetros según la fórmula $y = (A-B / [1 - (x / C) D]) + B$, donde A es la absorbancia máxima, B es la absorbancia mínima, C es la concentración que produce el 50% de la diferencia entre la absorbancia máxima y mínima de la absorbancia (o IC_{50}), y D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea. A menos que se indique lo contrario, los datos presentados corresponden a la media de al menos dos replicados.

30 Tampones

PBS es una solución salina 140 mM en un tampón fosfato 10 mM y, a menos que se indique lo contrario, el pH es de 7,5. PBST es PBS con 0,05% de Tween 20. PBhST es PBST con una solución salina a 280 mM. El tampón de hidrólisis es 237 mM de tampón fosfato con 50 mM de solución salina y el pH es 7,5. hPB es 250 mM tampón fosfato y el pH es 7,5. hPBT es hPB, con 0,1% Tween 20. Tampón de recubrimiento (*coating buffer*) es de 50 mM de carbonato-bicarbonato pH = 9,6. Tampón citrato es una solución 40 mM de citrato de sodio pH = 5,5. Tampón de borato es 0,2 M de ácido bórico / borato sódico, pH = 8,7. La solución de sustrato contiene 0,01% de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) y 0,004% de H_2O_2 en tampón de citrato.

40 Inmunoreactivos

Inmunógenos: PC1-HCH

El hapteno PC1 se acopló a hemocianina de molusco (HCH) siguiendo el método del anhídrido mixto (AM). El ácido carboxílico del hapteno PC1 (1,2 mg, 5 μ mol) se activó con cloroformiato de isobutilo (0,77 μ L, 6 μ mol) en presencia de tributilamina (1,3 μ L, 5,5 μ mol) en DMF anhidra (dimetilformamida, 100 μ L) bajo atmósfera de argón y un baño de hielo durante 30 minutos. El hapteno activado se añadió gota a gota a una solución de HCH (5 mg) en tampón de borato (900 μ L). La mezcla se agitó 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente durante la noche a 4°C. El conjugado se dializó frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 L) y la cantidad final de proteína recuperada después de la diálisis se cuantificó por ensayo de proteínas de Bradford. El conjugado se llevó a 2 mg/mL en PBS 10 mM, se alícuotó y se almacenó a -80°C. La alícuota de trabajo se mantuvo a 4°C.

Bioconjugados: PC1-BSA,

Fueron preparados usando el método del éster activo (EA) mediante la activación del hapteno (1,2 mg, 5 μ mol) con N-hidroxisuccinimida (NHS, 1,44 mg, 6 μ mol) y diciclohexilcarbodiimida (DCC, 5,2 mg, 6 μ mol) en DMF anhidra 100 μ L y agitando durante una hora a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se añadió gota a gota a una solución de BSA (albúmina de suero bovino, 10 mg) en tampón borato (1,8 mL) y se agitó durante 4h a t.a. El conjugado fue dializado y almacenado. Alternativamente, también se prepararon bioconjugados de PC1-BSA por el método del anhídrido mixto, los cuales se prepararon de forma paralela a los conjugados de PC1-HCH.

Análisis de la densidad de hapteno.

Las densidades de hapteno de los bioconjugados se calcularon midiendo el peso molecular (PM) de las proteínas nativas en comparación con el de los conjugados mediante análisis por MALDI-TOF-MS. En este sentido, los espectros de MALDI fueron obtenidos mediante la mezcla de 2 μ L de la matriz recién preparada (ácido trans-3,5-

dimetoxi-4-hidroxicinámico, 10 mg/mL en CH₃CN/H₂O 70:30, 0,1% ácido fórmico) con 2 µL de una solución de los conjugados o de las proteínas en CH₃CN/H₂O 70:30, 0,1% ácido fórmico (10 mg/mL). La densidad de hapteno (δ hapteno) se calculó según la siguiente ecuación: $\{PM(\text{conjugado}) - PM(\text{proteína})\} / PM(\text{hapteno})$.

5 La eficacia de acoplamiento evaluada por MALDI-TOF-MS de los inmunoreactivos correspondientes a una densidad de hapteno de 20 para el conjugado PC1-BSA (AM) y de 10 para el PC1-BSA (EA).

Antisueros policlonales.

10 Los antisueros policlonales As230, As231 y As232 fueron obtenidos mediante la inmunización de conejos (hembras) blancos New Zealand con pesos alrededor de 1-2 Kg con PC1-HCH (AM) siguiendo un protocolo ya descrito Ballesteros *et al.* (*Analytica Chimica Acta* **1997**, 347, 139). La evolución de los títulos de anticuerpos se evaluó mediante la medición de la unión de diluciones seriadas de cada antisuero a placas de microtitulación tapizadas con el conjugado de BSA homólogo. Una vez obtenidos títulos de anticuerpos aceptables, los animales
15 fueron desangrados y la sangre fue recolectada en tubos Vacutainer provistos con un gel de separación del suero. Los antisueros se obtuvieron por centrifugación y se almacenaron a -80°C en presencia de 0,02% NaN₃.

Después de llevar a cabo ensayos de titulación bidimensional (ELISA no competitivo indirecto) se establecieron las diluciones apropiadas de los antisueros y los antígenos de recubrimiento para el ELISA indirecto
20 competitivo. La mejor combinación fue As230/PC1-BSA (EA).

ELISA Indirecto competitivo As230/PC1-BSA (AE) para 1-hidroxifenazina

Muestras no hidrolizadas

25 Las placas de microtitulación se tapizaron con PC1-BSA (EA) (0,125 µg/ml con tampón de recubrimiento 100 µL/pocillo) durante 4h a 25°C con selladores adhesivos. A continuación, las placas fueron lavadas cuatro veces con PBST (300 µL/pocillo) antes de añadir los estándares (1-hidroxifenazina u otro tipo de analitos relacionados, a diferentes concentraciones desde 1000 nM a 0 nM en PBhST), y las muestras a diferentes concentraciones (50 µl/pocillo), seguido por la solución del antisuero As230 (dilución 1/8000 en PBhST, 50 µl/pocillo). Después de 30 min a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo cuatro veces con PBST y se añadió la solución anti-IgG-HRP (1/6000 en PBST, 100 µl/pocillo). Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, las microplacas se lavaron de nuevo cuatro veces con PBST y se añadió la solución de sustrato (100 µl/pocillo) y la reacción enzimática se detuvo después de 30 min a temperatura ambiente mediante H₂SO₄ 4N (50 µl/pocillo). Las absorbancias se midieron a 450 nm. La curva patrón se ajustó a una ecuación logística de cuatro parámetros según
30 la fórmula $y = (A - B / [1 - (x / C) D]) + B$, donde A es la absorbancia máxima, B es la absorbancia mínima, C es la concentración que produce el 50% de la diferencia entre la absorbancia máxima y mínima de la absorbancia (o IC₅₀), y D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea. El límite de detección (LOD) se define como la concentración que da el 90% de respuesta de la absorbancia máxima (IC₉₀) (véase Figura 1 y tabla 1).

40 Muestras hidrolizadas

El procedimiento es el mismo descrito para las muestras no hidrolizadas, utilizando placas de microtitulación recubiertas con PC1-BSA (0,25 µg/ml en tampón de recubrimiento 100 µL/pocillo) durante 4 horas a 25 ° C, y después los estándares de PC1, (de 3200 nM a 0 nM en tampón de hidrólisis) y las muestras (diluido en un
45 tampón de hidrólisis) se añaden a las microplacas seguido por la solución As230 (1/6000 diluido en hPBST, 50 µ l/pocillo). Los siguientes pasos, lavado, anti-IgG-HRP y la adición de solución de sustrato, son las mismas descritas para las muestras no hidrolizadas (véase la figura 1 y tabla 1).

Tabla 1. Parámetros del ensayo de ELISA As230/PC1-BSA (AE) en tampón, en esputo^a y en plasma^g

50

		Muestras no hidrolizadas		Muestras hidrolizadas		
		PBST ^c	Esputo diluido 1/20 en PBST ^{d,e}	Tampón de hidrólisis ^f	Esputo diluido 1/20 en PB 250 mM ^{d,e}	Plasma diluido 1/20 en PB 250 mM ^{d,e}
Parámetros del ensayo	Amax	0.78 ± 0.03	0.78 ± 0.09	0.85 ± 0.04	0.83 ± 0.04	0.84 ± 0.01
	Amin	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01
	Pendiente	-0.87 ± 0.04	-0.67 ± 0.03	-0.69 ± 0.01	-0.71 ± 0.01	-0.62 ± 0.07
	IC50 ^b	0.53 ± 0.04	14.4 ± 0.05	0.8 ± 0.01	11.2 ± 0.03	5.6 ± 0.07
	IC90 (LD) ^b	0.01 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.60 ± 0.01	2.4 ± 0.01
	R ²	0.992 ± 0.003	0.995 ± 0.004	0.997 ± 0.003	0.997 ± 0.003	0.994 ± 0.002

^a El esputo es un *pool* de esputos de 10 individuos no infectados con *P. aeruginosa*; ^b todas las concentraciones están expresadas en nM; ^c Los datos corresponden a una media de N=3, donde cada medida está realizada por triplicado; ^d Los datos mostrados son el promedio y desviación estándar de al menos dos pocillos replicados; ^e Los valores de concentración han estado multiplicados por veinte, para proporcionar el valor de detectabilidad real de la muestra de origen, teniendo en cuenta el factor de dilución aplicado antes del análisis para evitar las interferencias causadas por la matriz; ^f los valores de concentración se han multiplicado por dos, para proporcionar la detectabilidad real en la muestra original; antes de la hidrólisis. ^g El plasma es un *pool* de plasma de 10 individuos no infectados con *P. aeruginosa*

Determinaciones de reactividad cruzada.

5 Se prepararon soluciones madre de diferentes compuestos relacionados estructuralmente con la piocianina y la 1-hidroxifenazina (10 mM en sulfóxido de dimetilo) y se almacenaron a 4°C. Las curvas de calibración se prepararon en PBST y se ejecutan en el ELISA siguiendo el protocolo descrito antes. Los valores de reactividad cruzada se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (IC50 1-hidroxifenazina [nM] / IC50 compuestos fenazínicos [nM]) x 100 (Tabla 2)

Tabla 2. Reactividad cruzada de compuestos fenazínicos en el ensayo ELISA As230/PC1-BSA (AE)

ELISA		
Compuesto	IC ₅₀ (nM)	% RC
1-hidroxifenazina	0,62	100
Piocianina	>800	< 0,1
Fenazina	>800	< 0,1
Ác. Fenazina-2-carboxílico	>800	< 0,1
5-metilfenazinio sulfato de metilo	140	0,4

10 Muestras de Esputo

Esputos de 10 pacientes diagnosticados de no tener infección por *P. aeruginosa* fueron procesados en el Institut de Recerca de la Vall d'Hebron siguiendo el protocolo descrito por el mismo grupo *Clinical & Experimental Allergy* 2012, n/a-n/a. La recuperación de este proceso fue evaluada, para ello se doparon esputos (150 mg) con 1-hidroxifenazina (25 mM) y una vez procesado el esputo, se cuantificó la cantidad de 1-hidroxifenazina del sobrenadante mediante el ELISA As230/PC1-BSA (EA) después del tratamiento de esputos. Se preparó un *pool* de esputos blancos a partir de la mezcla de los sobrenadantes de los esputos de 10 personas no infectadas por *P. aeruginosa*. El *pool* de esputos fue utilizado para los estudios del efecto de la matriz, la evaluación del tratamiento de hidrólisis y estudios de precisión.

20

Muestras de Plasma

Se preparó un *pool* de plasmas blancos a partir de la mezcla de los sobrenadantes de los plasmas de 10 personas no infectadas por *P. aeruginosa*. El *pool* de plasmas fue utilizado para los estudios del efecto de la matriz y la evaluación del tratamiento de hidrólisis.

25

Hidrólisis de Muestras de Esputo

Se añadió NaOH 10M (100 µL) al sobrenadante del esputo (900 µL) y la mezcla se agitó durante 20 min, se neutralizó con HCl 10 M (100 µL) y se diluyó 20 veces con hPB.

30

Hidrólisis de Muestras de Plasma

Se añadió NaOH 10M (100 µL) al sobrenadante del plasma (900 µL) y la mezcla se agitó durante 20 min, se neutralizó con HCl (100 µL) y se diluyó 5 veces con hPB.

35

Hidrólisis de Muestras de Esputo

Se añadió NaOH 10M (100 µL) al sobrenadante del esputo (900 µL) y la mezcla se agitó durante 20 min, se neutralizó con HCl 10 M (100 µL) y se diluyó 20 veces con hPB.

40

Estudios de efecto matriz del Esputo

Las interferencias no específicas producidas por el esputo han sido evaluadas por la preparación de curvas de calibrado estándar de esputo (nativo o hidrolizado) a varios factores de dilución (1/5, 1/10, 1/20) y siendo

45

analizadas posteriormente por el ELISA para comparar el paralelismo con la curva estándar preparada en tampón PBhST o en tampón de hidrólisis, respectivamente (véase Figura 1 y tabla 1).

Estudios de efecto matriz del plasma

5 Las interferencias no específicas producidas por el plasma han sido evaluadas por la preparación de curvas de calibrado estándar de esputo (nativo o hidrolizado) a varios factores de dilución (1/2, 1/5, 1/10, 1/20) y siendo analizadas posteriormente por el ELISA (véase tabla 1).

10 Estudios de precisión

Para la evaluación de este parámetro se prepararon muestras ciegas dopadas a diferentes concentraciones de analito y a posteriori se procedió a su medición mediante ELISA en la curva de calibrado correspondiente. Las medidas se realizaron por triplicado y utilizando como curva patrón en una dilución apropiada correspondiente. **Muestras de tampón no hidrolizadas.** Se prepararon 7 muestras ciegas en PBS dopadas a diferentes concentraciones de 1-hidroxifenazina y se midieron sin dilución en la curva patrón de ELISA (véase Figura 2 (superior)). **Muestras de tampón hidrolizadas.** Se prepararon 14 muestras ciegas en PBS. 7 de ellas dopadas a diferentes concentraciones de 1-hidroxifenazina y las 7 restantes dopadas a diferentes concentraciones de piocianina. Todas las muestras fueron sometidas al tratamiento de hidrólisis, se añadió NaOH 10M (100 µL) a las muestras ciegas (900 µL) y la mezcla se agitó durante 20 minutos. A continuación, se neutralizó con HCl 10M (100 µL) y las muestras se diluyeron a ½ con hPB. Finalmente, las muestras se midieron en el correspondiente curva patrón (véase la Figura 2 (inferior)). **Muestras de esputo no hidrolizadas.** El procedimiento fue el mismo que el descrito para las muestras de tampón no hidrolizadas, en este caso se prepararon 4 muestras ciegas de 1-hidroxifenazina a distintas concentraciones dopadas en esputo blanco. Una vez preparadas las muestras se diluyeron 20 veces con PBhST y se midieron en la curva patrón del ELISA correspondiente. **Muestras de esputo hidrolizadas.** El procedimiento fue el mismo que el descrito para las muestras de tampón hidrolizadas, en este caso se prepararon 9 muestras ciegas de piocianina dopadas preparadas en esputo blanco. Una vez preparadas las muestras se hidrolizaron y se diluyeron 20 veces con hPB y se midieron en la curva patrón del ELISA correspondiente (véase tabla 3).

30 **Tabla 3.** Resultados de los estudios de recuperación del ensayo ELISA As230/PC1-BSA (EA) realizados en esputo^a.

	Concentración Dopada	Concentración Medida ^b	Recuperación (%)
piocianina	2.5	2.34 ± 0.37	94
	5	4.25 ± 1.15	85
	50	55.57 ± 7.5	111
	250	179.63 ± 17.17	72
	500	555.66 ± 88.49	110
	1000	1035.88 ± 25.39	103
	10000	7219.19 ± 829.25	72
	50000	50146.19 ± 1685.17	100
	100000	72434.53 ± 1347.23	73
1-hidroxifenazina	0.5	0.48 ± 0.05	96
	5	4.32 ± 0.56	86
	50	51.66 ± 2.38	103
	250	246.09 ± 43.14	98

^a Las muestras de esputos se prepararon utilizando un pool de esputos de individuos sanos, a continuación fueron dopados con 1-hidroxifenazina o piocianina, tratados tal y como se describe en el apartado de Hidrólisis de Muestras de Esputo y medidas por ELISA en la correspondiente curva de calibración. Todas las concentraciones se expresan en nM^{b,d}. Los resultados mostrados son el promedio y desviación estándar de al menos tres pocillos replicados.

Resultados

Se ha desarrollado un nuevo ensayo inmunoquímico para la detección de 1-hidroxifenazina y piocianina utilizando los anticuerpos dirigidos contra 1-hidroxifenazina. La piocianina sólo difiere de 1-hidroxifenazina en el grupo metilo del N5. Un simple tratamiento de hidrólisis permite la eliminación de este grupo metilo de la piocianina para convertirla en 1-hidroxifenazina, lo cual permite la cuantificación de ambos analitos utilizando un único anticuerpo.

La mezcla de haptenos PC1 obtenido se utilizó para preparar el inmunógeno (PC1-HCH) con el fin de generar anticuerpos contra 1-hidroxifenazina. La afinidad de los anticuerpos obtenidos (As230-As232) frente los bioconjugados PC1-BSA (EA y AM) se evaluó mediante ensayos inmunoquímicos de competencia con la intención de averiguar las condiciones más adecuadas. Como resultado de estos experimentos, se obtuvieron cinco inmunoensayos competitivos, de los cuales la combinación As230/PC1-BSA antisuero / bioconjugado (EA) presentaba los mejores parámetros y por lo tanto se escogió para estudios posteriores. El ensayo escogido es estable entre pH 5 y pH 9,5, tampoco se ve significativamente afectado por el contenido de Tween 20, pero con una alta concentración de sales en el tampón de ensayo el ELISA proporciona una mejora en términos de detectabilidad y por esta razón el tampón de ensayo contiene una concentración salina de 280 mM (conductividad de 27,2 mS cm⁻¹). En las condiciones establecidas, muestras de 1-hidroxifenazina en tampón pueden ser analizadas en 1.30 h con un límite de detección de 0,01 ± 0,01 nM (N=3, ver tabla 1 y Figura 1).

Condiciones de ensayo

Estudios de especificidad demostraron que el ensayo fue muy específico para 1-hidroxifenazina (véase tabla 2). Otras fenazinas mostraron una reactividad cruzada inferior al 0,1%, incluyendo piocianina. Por lo tanto, fue necesario desarrollar un método simple para convertir piocianina en 1-hidroxifenazina con un buen rendimiento. Esto se podría lograr mediante el tratamiento de las soluciones piocianina con NaOH 1 M durante 20 min a t.a. La hidrólisis del grupo metilo se controló por HPLC-UV utilizando fenazina como estándar interno y los resultados demostraron que la conversión es cuantitativa en estas condiciones. Tal como se muestra en la Figura 2 (inferior), se observó una buena correlación ($R^2=0,943$) entre las muestras medidas y las muestras dopadas para la detección de piocianina una vez hidrolizada.

Por lo tanto, tanto 1-hidroxifenazina como piocianina de una muestra particular se pueden medir simultáneamente. Para ello, la muestra se divide en dos partes, una de ellas se utiliza directamente para la cuantificación inmunoquímica de la 1-hidroxifenazina, mientras que la segunda fracción se hidroliza antes del análisis, con el fin de convertir la piocianina a 1-hidroxifenazina usando el procedimiento descrito anteriormente, acto y seguido se analizan por ELISA para obtener el contenido total 1-hidroxifenazina. La diferencia entre estas dos mediciones corresponderá con la concentración piocianina en la muestra.

Los estudios dirigidos a evaluar las posibles interferencias no específicas causadas por el proceso de hidrólisis en el ELISA mostraron que estos efectos fueron despreciables y podía ser corregida cambiando ligeramente las condiciones de ensayo. Por lo tanto, después del tratamiento con NaOH y la posterior adición de HCl, las muestras se diluyeron con tampón borato 250 mM con el fin de tamponar las muestras y minimizar la concentración salina, ya que dichos parámetros influyen en las mediciones de ELISA. Teniendo en cuenta, la conversión cuantitativa de piocianina en 1-hidroxifenazina, la piocianina se puede detectar en tampón con un valor de LOD de 0,04 ± 0,01 nM (N=3). Para ambos casos, la cuantificación de 1-hidroxifenazina y piocianina en tampón, resultó ser exacta como se puede apreciar en la Figura 2, donde se muestran los estudios de correlación entre las muestras dopadas y las medidas obtenidas en el ELISA. La pendiente del análisis de regresión está siempre cerca de 1, y los coeficientes de regresión también son buenos para ambos analitos.

Determinaciones en muestras de esputo

Dado que los pacientes infectados por *P. aeruginosa* presentan altas concentraciones de piocianina en sus esputos, se aplicó esta metodología al análisis de las muestras de esputos.

Así, se obtuvieron muestras de esputos de pacientes no infectados por *P. aeruginosa* y se agruparon para investigar las posibles interferencias no específicas causadas por la matriz. En primer lugar, las muestras de esputos fueron tratadas como se describe en la sección experimental, se diluyeron con el tampón de ensayo varias veces, y las distintas diluciones de la muestra se utilizaron para evaluar interferencias en el ELISA. Ambos, el esputo intacto y las muestras hidrolizadas de esputos no interfieren significativamente en el ensayo. Una dilución de 20 veces con PBST o con el tampón de hidrólisis se encontró que era suficiente para evitar las interferencias causadas por los componentes de esputos (véase la Figura 1 y tabla 1). Teniendo en cuenta el factor de dilución aplicado, 1-hidroxifenazina y piocianina pueden ser analizadas en muestras de esputo con un LOD de 0,4 ± 0,01 nM (N = 3), y 0,6 ± 0,01 nM (N=3), respectivamente.

Por último, se prepararon un conjunto de muestras ciegas de esputo utilizando el *pool* de esputo proveniente de individuos sanos. Las muestras de esputos se doparon con 1-hidroxifenazina y piocianina, las

muestras de piocianina se hidrolizaron y se cuantificaron por ELISA. Como se puede observar en la Tabla 3, las recuperaciones fueron buenas en ambos casos, hecho que demuestra que el procedimiento inmunoquímico desarrollado es capaz de cuantificar los analitos en este tipo de muestras de manera rápida y eficaz.

5 Determinación en muestras de plasma

Debido a la importancia de poder detectar la presencia de *P. aeruginosa* en plasma en pacientes con sepsis o bactericemias y así poder dar un tratamiento adecuado al paciente que nos permita eliminar dicha infección, se aplicó esta metodología al análisis de las muestras de plasma.

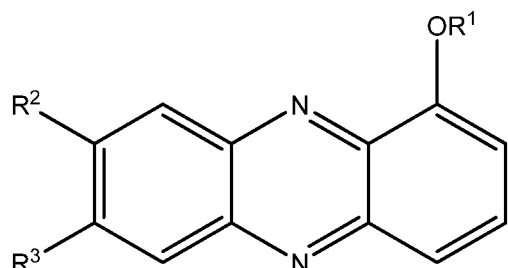
10

Así, se obtuvieron muestras de plasma de pacientes no infectados por *P. aeruginosa* y se agruparon para investigar las posibles interferencias no específicas causadas por la matriz. En primer lugar, las muestras de plasma fueron tratadas como se describe en la sección experimental, se diluyeron con el tampón de ensayo varias veces, y las distintas diluciones de la muestra se utilizaron para evaluar interferencias en el ELISA. Ambos, el plasma intacto y las muestras hidrolizadas de plasma no interfieren significativamente en el ensayo. Una dilución de 5 veces con PBST o con el tampón de hidrólisis se encontró que era suficiente para evitar las interferencias causadas por los componentes de esputos (véase tabla 1). Teniendo en cuenta el factor de dilución aplicado, la piocianina puede ser analizada en muestras de plasma con un LOD de $2,4 \pm 0,01$ nM (N = 2).

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general I



(I)

caracterizado por que:

R¹ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,

R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,

R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,

R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,

R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6,

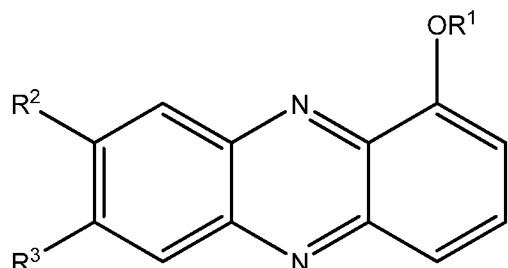
con la condición de que dicho compuesto no es un compuesto de fórmula general I de los siguientes:

I-a. donde R¹ es H, R² es COOH y R³ es H; o

I-b. donde R¹ es seleccionado entre H y alquilo C₁₋₂, R² es seleccionado entre (CH₂)₁₋₃-COOH y (CH₂)₁₋₃-COOCH₃ y R³ es H; o

I-c. donde R¹ es seleccionado entre H y alquilo C₁₋₂, R² es H y R³ es seleccionado entre (CH₂)₁₋₃-COOH y (CH₂)₁₋₃-COOCH₃.

2. Uso de al menos un compuesto de fórmula I,



(I)

donde:

R¹ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,

R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,

R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,

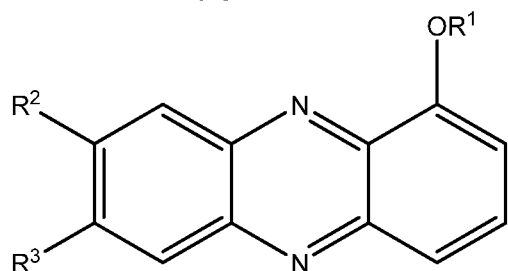
R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,

R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6,

como hapteno.

3. Conjugado que comprende al menos un hapteno de fórmula I,



(I)

donde:

R¹ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,

R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,

R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,

R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,

R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄, y

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6;

con la condición de que dicho compuesto no es un compuesto de fórmula general I de los siguientes:

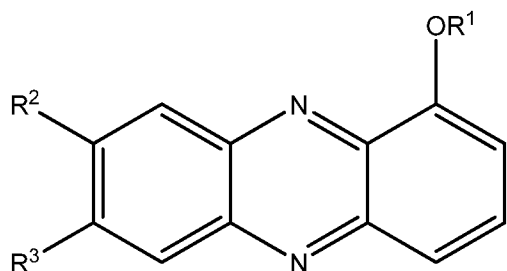
I-a. donde R¹ es H, R² es COOH y R³ es H; o

5 I-b. donde R¹ es seleccionado entre H y alquilo C₁₋₂, R² es seleccionado entre (CH₂)₁₋₃-COOH y (CH₂)₁₋₃-COOCH₃ y R³ es H; o

I-c. donde R¹ es seleccionado entre H y alquilo C₁₋₂, R² es H y R³ es seleccionado entre (CH₂)₁₋₃-COOH y (CH₂)₁₋₃-COOCH₃,

10 y un segundo componente que es una proteína transportadora, o un fragmento de la misma, que confiere antigenicidad.

4. Conjugado según la reivindicación 3, que además de dicho hapteno de fórmula I comprende un segundo hapteno de fórmula I,



15 (I)

donde:

R¹ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄,

R² se selecciona entre H y (CH₂)_m-COR⁴,

R³ es (CH₂)_m-COR⁴ si R² es H, o R³ es H si R² es (CH₂)_m-COR⁴,

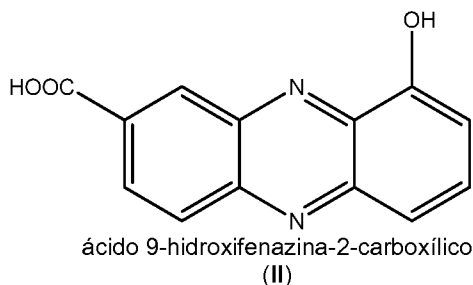
20 R⁴ se selecciona entre H y OR⁵,

R⁵ se selecciona entre H y alquilo C₁₋₄, y

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6;

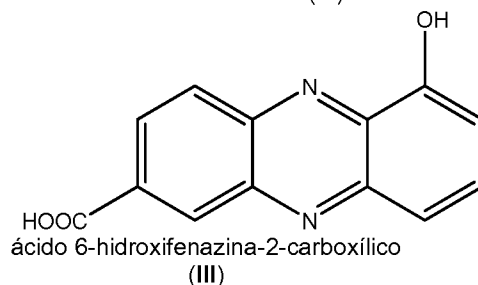
5. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, donde el hapteno de fórmula I comprende una mezcla de ácido 9-hidroxifenazina-2-carboxílico (II) y de ácido 6-hidroxifenazina-2-carboxílico (III).

25



ácido 9-hidroxifenazina-2-carboxílico

(II)

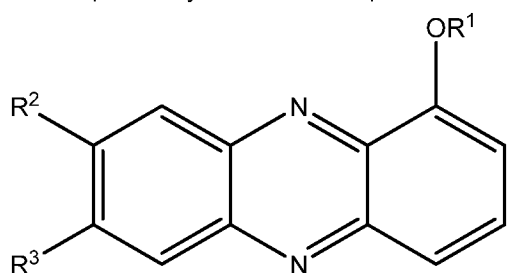


ácido 6-hidroxifenazina-2-carboxílico

(III)

30 6. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que el segundo componente es una proteína transportadora, o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad, donde dicha proteína transportadora se selecciona del grupo que consiste en: hemocianina de cangrejo herradura (HCH) y seroalbúmina bovina (BSA).

35 7. Método de obtención de un conjugado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 caracterizado por que comprende crear una unión covalente, directa o a través de un agente de entrecruzamiento, entre la proteína y al menos un hapteno de fórmula general I,



40 (I)

donde:

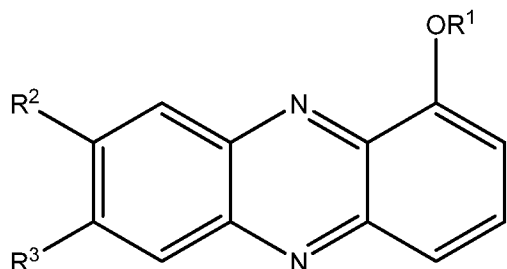
R^1 se selecciona entre H y alquilo C_{1-4} ,
 R^2 se selecciona entre H y $(CH_2)_m-COR^4$,
 R^3 es $(CH_2)_m-COR^4$ si R^2 es H, o R^3 es H si R^2 es $(CH_2)_m-COR^4$,
 R^4 se selecciona entre H y OR^5 ,

5 R^5 se selecciona entre H y alquilo C_{1-4} , y

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6,

preferentemente la unión covalente del hapteno de fórmula I se lleva a cabo a través del grupo $-(CH_2)_m-COR^4$ del sustituyente R^2 o R^3 diferente de H.

10 **8.** Uso de un conjugado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 o un conjugado que comprende al menos un hapteno de fórmula general I,



donde:

R^1 se selecciona entre H y alquilo C_{1-4} ,

15 R^2 se selecciona entre H y $(CH_2)_m-COR^4$,

R^3 es $(CH_2)_m-COR^4$ si R^2 es H, o R^3 es H si R^2 es $(CH_2)_m-COR^4$,

R^4 se selecciona entre H y OR^5 ,

R^5 se selecciona entre H y alquilo C_{1-4} , y

m es un número entero seleccionado entre 0 y 6

20 y un segundo componente que es una proteína transportadora, o un fragmento de la misma, que confiere antigenicidad, para la producción de anticuerpos.

9. Anticuerpo que reconoce específicamente un conjugado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 u 8, o antisuero que comprende dicho anticuerpo y opcionalmente el anticuerpo comprende un agente de marcaje detectable, preferentemente el anticuerpo es policlonal.

10. Método *in vitro* para detectar y/o cuantificar al menos una fenazina, dicha fenazina seleccionada entre piocianina y/o 1-hidroxifenazina, en una muestra que comprende el uso de un anticuerpo o un antisuero según se define en la reivindicación 9 y opcionalmente utiliza un conjugado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 u 8.

11. Método según la reivindicación 10 que, cuando comprende detectar y/o cuantificar piocianina, el método comprende un tratamiento previo de la muestra en condiciones adecuadas de conversión de piocianina a 1-hidroxifenazina mediante agentes químicos o biológicos adecuados.

12. Método según la reivindicación 10 donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo mediante una técnica inmunoquímica, preferentemente la técnica inmunoquímica es un ELISA competitivo indirecto.

13. Método según la reivindicación 11, donde la técnica inmunoquímica la técnica inmunoquímica es un ELISA competitivo indirecto y comprende las siguientes etapas:

a. inmovilizar un conjugado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 u 8 en un soporte sólido,

b. eliminar el conjugado no inmovilizado,

c. añadir la muestra a analizar que puede tener una infección causada por *Pseudomonas aeruginosa*, preferentemente una muestra de esputo y/o plasma, y un primer anticuerpo anti-fenazina definido en la reivindicación 9 en el soporte sólido del apartado **a.** e incubar,

d. eliminar el primer anticuerpo no unido al conjugado,

e. añadir un segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable, reconociendo dicho segundo anticuerpo al primer anticuerpo e incubar,

f. eliminar el segundo anticuerpo no unido al primer anticuerpo, y

50 **g.** detectar y/o cuantificar el complejo obtenido según el apartado **e.** con una composición que contiene un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

14. Método según la reivindicación 13 que, cuando comprende detectar y/o cuantificar piocianina, previamente a poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-fenazina en apartado **c.** dicho método comprende además **c'**, tratar la muestra en condiciones adecuadas de conversión de piocianina a 1-hidroxifenazina mediante agentes químicos o biológicos adecuados, en especial medio básico.

15. Kit para la detección y/o cuantificación de piocianina y/o 1-hidroxifenazina en una muestra, caracterizado por que comprende al menos un anticuerpo anti-fenazina definido en la reivindicación 9, o un antisuero que comprende dicho anticuerpo, o un conjugado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, o cualquier combinación de los mismos, preferentemente además comprende al menos un anticuerpo contra los anticuerpos anti-fenazina.
- 5

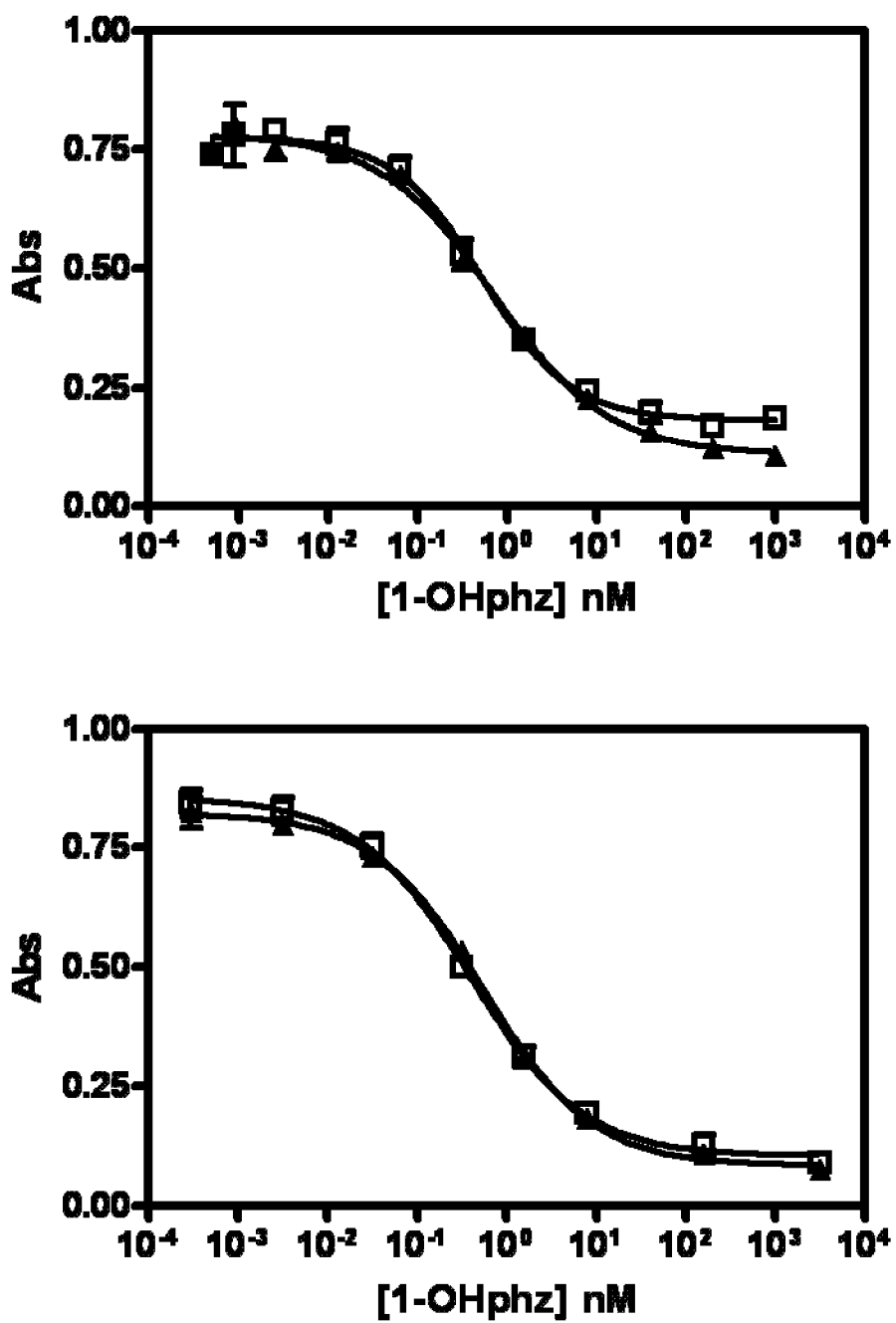


FIGURA 1

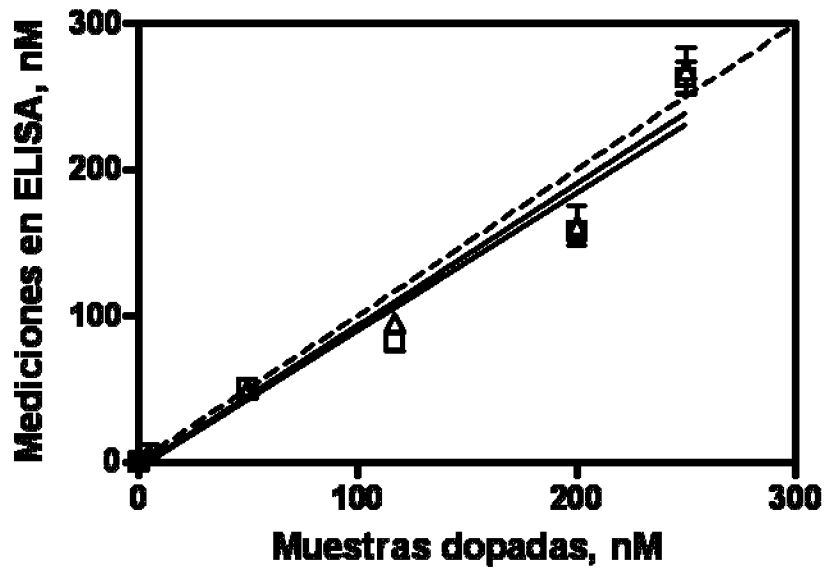
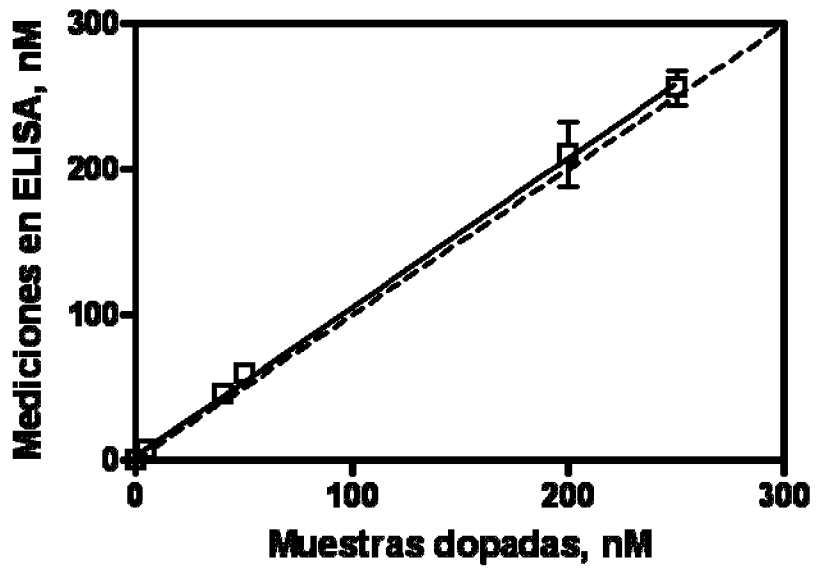


FIGURA 2