



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 783**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/531** (2006.01)  
**C07K 16/44** (2006.01)  
**G01N 33/94** (2006.01)  
**C07D 211/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02079785 .8**  
86 Fecha de presentación : **15.11.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1312923**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

54 Título: **Método y estuche para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo y metabolitos de análogos de fentanilo.**

30 Prioridad: **16.11.2001 EP 01204401**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **Randox Laboratories Ltd.**  
**Ardmore, Diamond Road**  
**Crumlin County Antrim BT29 4QY, GB**

72 Inventor/es: **McConnell, Robert Ivan;**  
**Benchikh, El Ouard;**  
**Fitzgerald, Stephen Peter y**  
**Lamont, John Victor**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 284 783 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**

Método y estuche para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo y metabolitos de análogos de fentanilo.

La presente invención se refiere a un método y un estuche para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos, preferiblemente nor-metabolitos, tanto de fentanilo como de sus análogos, así como inmunógenos, conjugados y anticuerpos usados en los mismos.

Por “detectar” se entiende analizar cualitativamente la presencia o ausencia de una sustancia.

Por “determinar” se entiende analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia presente.

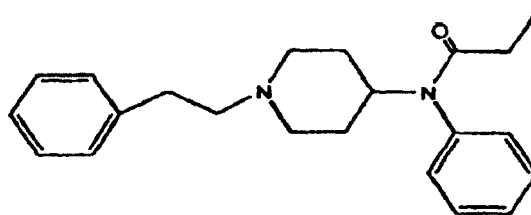
Por “fentanilo” se entiende N-(1-fenetil-4-piperidinil)-N-fenilpropionamida.

Por “análogos de fentanilo” se entiende sustancias que comparten similitud estructural con la estructura de N-fenil-N-(4-piperidinil)amina del fentanilo y que comparten actividad farmacológica con el fentanilo. Tales “análogos de fentanilo” incluyen, pero no se limitan a, sufentanilo, carfentanilo, acetilfentanilo, p-fluorofentanilo, bencilfentanilo, tienilfentanilo,  $\alpha$ -metiltienilfentanilo, butirilfentanilo y alfentanilo, así como los llamados fármacos de diseño  $\alpha$ - y p-metilfentanilo y 3-cis/trans-metilfentanilo.

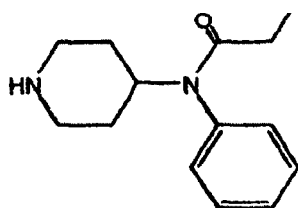
Por “metabolitos” se entiende los productos de degradación, in vivo, tanto de fentanilo como de análogos de fentanilo. Así, para el fentanilo, esto abarca norfentanilo (N-(propionil)-4-N-ainilopiperidina), despropionilfentanilo (N-(1-fenetil-4-piperidinil)fenilamina), p-hidroxifentanilo (N-(p-hidroxifenil)-N-[1-(2-feniletíl)-4-piperidinil]propanamida) y p-hidroxinorfentanilo (N-propionil-4-N-(p-hidroxianilino)piperidina).

La presente invención está destinada a tener amplia aplicabilidad a través de metabolitos, tanto de fentanilo como de análogos de fentanilo. La presente invención está destinada a tener una aplicabilidad particular a nor-metabolitos, tanto de fentanilo como de análogos de fentanilo. La presente invención está destinada a tener la aplicabilidad más particular a nor-metabolitos de fentanilo. La presente invención también está destinada a tener amplia aplicabilidad a través del propio fentanilo y sus análogos.

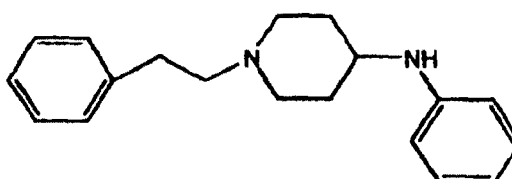
El fentanilo es un potente opioide sintético con al menos 80 veces más potencia que la morfina como un analgésico. Habitualmente se usa perioperativamente para la inducción y el mantenimiento de la anestesia y postoperativamente para analgesia. Se han sintetizado análogos de fentanilo para incrementar su efecto analgésico y eufórico. Debido a su alta potencia y analgesia narcótica de acción rápida, el fentanilo y sus análogos tienen potencial de abuso. El fentanilo se distribuye rápidamente desde la sangre hacia tejidos corporales y es metabolizado intensivamente. En el hombre, aproximadamente 80% de una dosis de fentanilo es excretado en la orina en menos de 72 horas, consistiendo en metabolitos de 92% a 98% de este. La N-desalquilación oxidativa para formar norfentanilo es la principal ruta metabólica para el fentanilo en el hombre (Silverstein y otros, 1993). La N-desalquilación también parece característica de análogos de fentanilo tales como alfentanilo y sufentanilo (Camu y otros (1982) y Meuldermans y otros (1982)). En contraste, en caballos, la principal ruta metabólica es a través de la oxidación metabólica de la cadena lateral propionílica del fentanilo, para formar un ácido malonanílico (Frincke y otros (1980)). La estructura química del fentanilo está representada a continuación:



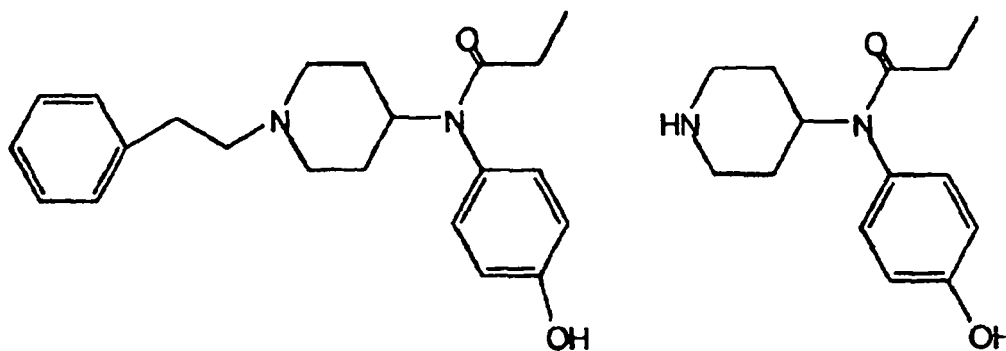
El fentanilo, que tiene una semivida de 10 minutos, se metaboliza, al menos en seres humanos, para dar principalmente:



Norfentanilo



Despropionilfentanilo

p-Hidroxiifenitilanop-Hidroxinorfenitilano

Se han usado diversos métodos para determinar la cantidad de metabolitos de fentanilo y sus análogos en una muestra. Métodos analíticos incluyen cromatografía de gases con ionización a la llama, captura electrónica y detección sensible a nitrógeno y cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS). Por ejemplo, un método cromatográfico de gas-líquido sensible para analizar los nor-metabolitos de fentanilo y 3-metilfentanilo en la orina se describe en W.R. Hammargren y G.L. Henderson, 1988. El método descrito incluye la detección mediante detector de captura electrónica o espectrometría de masas. Sin embargo, tales métodos cromatográficos son demasiado costosos y consumen mucho tiempo para el uso como herramientas de rastreo.

Los radioinmunoensayos usados para la determinación de la cantidad de fentanilo y sus análogos son muy sensibles, pero requieren trazadores radionucleídicos, por ejemplo  $^{125}\text{I}$  y  $^3\text{H}$ , y, en algunos casos, una etapa de extracción preliminar. Por ejemplo, diversos tipos diferentes de radioinmunoensayos (RIAs), incluyendo RIA en fase sólida, se usan para detectar fentanilo y análogos relacionados. Hammargren y Henderson (1988) describen el uso de un RIA de  $^{125}\text{I}$  producido por Diagnostic Products. Sin embargo, se encontró que los nor-metabolitos y los despropionilmetabolitos no reaccionan cruzadamente de forma significativa usando el radioinmunoensayo. Además, Watts y Caplan (1990) describen un RIA para fentanilo (también un RIA de  $^{125}\text{I}$  de Diagnostic Products), que confirma los datos de Hammargren y Henderson (1988), a saber, con escasa reactividad cruzada para ciertos metabolitos de fentanilo, específicamente menos de 5% (Tabla IV respuesta de análogo/respuesta de fentanilo) para norfentanilo y 14-30% (Tabla IV respuesta de análogo/respuesta de fentanilo) para 2-hidroxiifenitilano. Con relación al 2-hidroxiifenitilano, se cree actualmente que no es un metabolito principal del fentanilo, al menos en el hombre, a pesar de las referencias al mismo en Watts y Caplan. Michiels y otros (1977) describen un RIA de  $^3\text{H}$  para fentanilo de Janssen usando carboxifenitilano como el hapteno - no se observó reacción cruzada con despropionilfentanilo ni norfentanilo, los principales metabolitos de fentanilo en seres humanos. De forma similar, Henderson y otros (1975) describen un RIA de fentanilo de McNeil Laboratories que usa carboxifenitilano como el hapteno, pero la totalidad de los nor- y despropionilmetabolitos de fentanilo no reaccionan cruzadamente de forma significativa.

Los ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISAs) son una alternativa no radiactiva, que también se conoce para la determinación de la cantidad de fentanilo y sus análogos. Por ejemplo, en Werawan Ruangyuttikarn y otros, 1990, se describe un ELISA prototípico para detectar la presencia de fentanilo usando un hapteno de carboxifenitilano. Esta descripción, que obvia explícitamente la reactividad cruzada frente a metabolitos de fentanilo, muestra que la modificación acerca del resto de piperidina altera drásticamente la reactividad cruzada - esto sugiere que podría esperarse una escasa reactividad cruzada para el norfentanilo. Gregory S. Makowski y otros, 1995, describen un ELISA con escasa reactividad cruzada frente a metabolitos de despropionilfentanilo y norfentanilo, específicamente, solo 0,53% de reactividad cruzada frente a despropionilfentanilo y menos de 0,03% de reactividad cruzada frente a norfentanilo.

Un trabajo previamente presentado sobre inmunoensayos para fentanilo (ya sean RIA o ELISA) se ha centrado solamente, según el conocimiento de los inventores, en la derivación de fentanilo (mediante un grupo carboxilo) a través del extremo libre de grupo propionamida del fentanilo. Tal derivación, usando  $-\text{COOH}$  como el reticulador, da como resultado carboxifenitilano (N-fenil-N-[1-(2-fenil)-4-piperidinil]carboxipropionamida) como el hapteno, hapteno que se describe en J. McDonald y otros, 1987. J. McDonald y otros describen un inmunoensayo de fluorescencia de concentración de partículas (PCFIA) que usa un antisuero producido a partir de un inmunógeno de carboxifenitilano-albúmina de suero bovino (BSA) y carboxifenitilano conectado a p-ficoeritrina. De forma similar, M. Michiels y otros (1977) describen un inmunógeno de carboxifenitilano-BSA. Anticuerpos producidos para un inmunógeno de carboxifenitilano-gammaglobulina bovina (BGG) son descritos en G.L. Henderson y otros, 1975. Sin embargo, los anticuerpos y conjugados producidos contra carboxifenitilano como el hapteno tienen la desventaja de que existe poca o ninguna capacidad para detectar metabolitos de fentanilo y/o metabolitos de análogos de fentanilo.

La presente invención describe la unión de un nuevo derivado hapténico de fentanilo o norfentanilo, conectándose el hapteno covalentemente bien a un material portador que confiere antigenicidad, para producir un inmunógeno, o

bien a un agente marcador detectable, para producir un conjugado (o reactivo de detección). La presente invención también describe cómo se emplean anticuerpos generados para este inmunógeno en el desarrollo de un ensayo genérico, que puede usarse para determinar la cantidad de metabolitos de fentanilo y metabolitos de sus análogos en fluidos, preferiblemente fluidos biológicos, más preferiblemente fluidos biológicos de seres humanos.

5

### Objetivos de la invención

Un objetivo de la invención es vencer algunas o todas las desventajas de la técnica anterior o proporcionar una alternativa a las mismas.

10

Un objetivo de una modalidad preferida de la invención es proporcionar un método y un estuche para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo y/o metabolitos de análogos de fentanilo. Un objetivo de una modalidad más preferida de la invención es proporcionar un método y un estuche para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo y/o metabolitos de análogos de fentanilo, que muestran más de 5%, preferiblemente más de 25%, de reactividad cruzada para los metabolitos de fentanilo y/o los metabolitos de análogos de fentanilo, más preferiblemente los nor-metabolitos, cuando se comparan con el propio fentanilo.

15

Un objetivo adicional de una modalidad preferida de la presente invención es desarrollar anticuerpos capaces de unirse a, como un epítopo estructural, un resto de N-fenil-N-(4-piperidinil)amina.

20

### Descripción detallada de la invención

La invención proporciona métodos, estuches, conjugados, inmunógenos, anticuerpos y procedimientos como los detallados en las reivindicaciones adjuntas.

25

En un primer aspecto, se proporciona un inmunógeno que comprende un hapteno acoplado a un material portador que confiere antigenicidad, derivándose el hapteno con un reticulador en la posición 1, 2 ó 4, preferiblemente en la posición 1 ó 2, con la condición de que el reticulador no sea carboxilo cuando el hapteno se deriva en la posición 1.

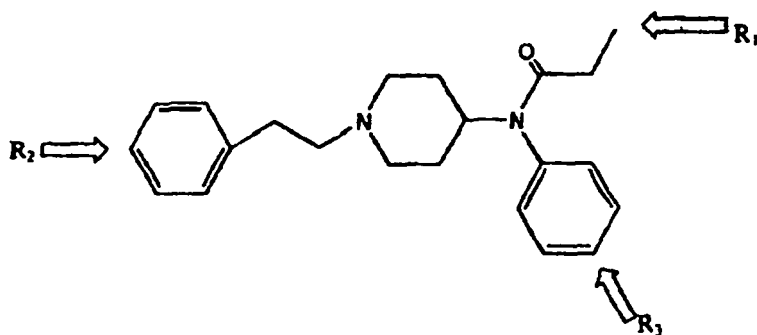
30

La posición 1 se define como el extremo libre o terminal del grupo propionamida del fentanilo. La posición 2 se define como la posición para del grupo fenilo del fentanilo. La posición 3 se define como la posición para del grupo N-fenilo del fentanilo. La posición 4 se define como el piperidinil-N del norfentanilo. Las posiciones 1-4 se indican como R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub>, respectivamente, en la Figura 1a de los dibujos adjuntos.

35

Las posiciones de derivación 1, 2, 3 y 4 en los haptenos descritos en la presente invención se indican posteriormente teniendo en cuenta las fórmulas estructurales del fentanilo o el norfentanilo:

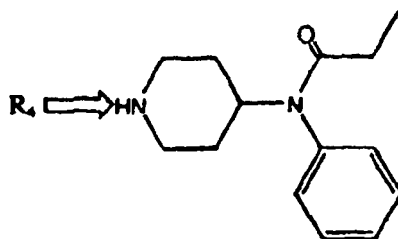
40



45

50

55



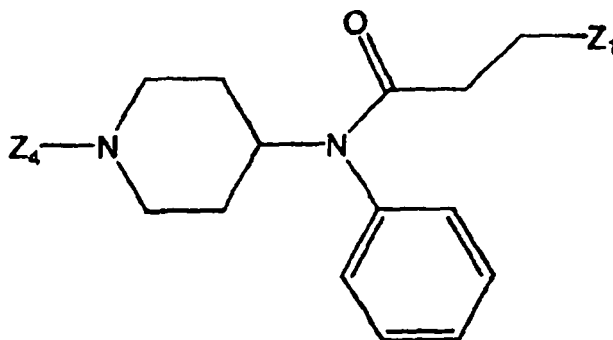
60

65

# ES 2 284 783 T3

Más específicamente, en un primer aspecto, se proporciona un inmunógeno de la fórmula:

5



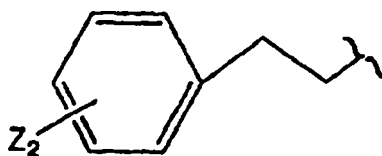
10

15

en la que  $Z_1$  es un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad o hidrógeno;  $Z_4$  se selecciona de N-fenilo, un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad o

20

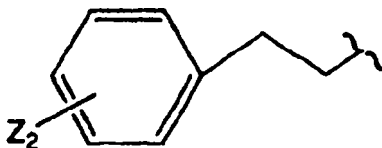
25



30

en la que  $Z_2$  es un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad en una posición orto, meta o para; y, cuando  $Z_1$  sea hidrógeno,  $Z_4$  sea un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad o

35

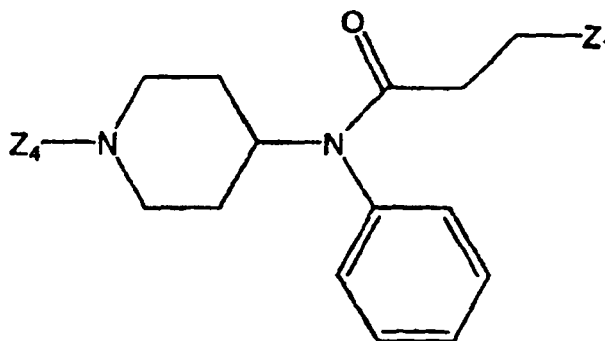


40

en la que  $Z_2$  es un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad en una posición orto, meta o para; y, cuando  $Z_4$  sea N-fenilo,  $Z_1$  sea un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad, no siendo el reticulador -COOH. Preferiblemente, el material portador es una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético.

En un aspecto adicional, se proporciona un conjugado de la fórmula:

45



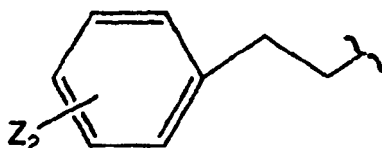
50

55

en la que  $Z_1$  es un reticulador unido covalentemente a un agente marcador detectable, o hidrógeno;  $Z_4$  se selecciona de N-fenilo, un reticulador unido covalentemente a un agente marcador detectable o

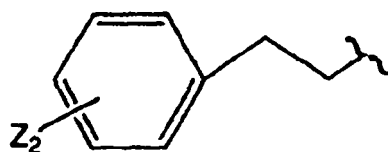
60

65



# ES 2 284 783 T3

en la que  $Z_2$  es un reticulador unido covalentemente a un agente marcador detectable en una posición orto, meta o para; con las condiciones de que, cuando  $Z_1$  sea hidrógeno,  $Z_4$  sea un reticulador unido covalentemente a un agente marcador detectable o



en la que  $Z_2$  es un reticulador unido covalentemente a un agente marcador detectable en una posición orto, meta o para; y, cuando  $Z_4$  sea N-fenilo,  $Z_1$  sea un reticulador unido covalentemente a un agente marcador detectable, no siendo el reticulador  $-COOH$ . Preferiblemente, el agente marcador se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radiactiva o una mezcla de las mismas. Más preferiblemente, el agente marcador es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, lo más preferiblemente peroxidasa de rábano picante. Alternativamente, o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente.

Se apreciará que, en los haptenos descritos, solo una de las posiciones  $Z_1$ ,  $Z_2$  y  $Z_4$  es un reticulador y que, en los inmunógenos y conjugados de la presente invención, solo una de las posiciones  $Z_1$ ,  $Z_2$  y  $Z_4$  incluye un reticulador conectado covalentemente bien a un material portador que confiere antigenicidad o bien a un agente marcador detectable, respectivamente.

También se apreciará que, cuando  $Z_1$  es hidrógeno y  $Z_4$  es N-fenilo, el compuesto resultante es fentanilo y, cuando  $Z_1$  y  $Z_4$  son cada uno hidrógeno, el compuesto resultante es norfentanilo.

La Tabla 1 posterior resume los reticuladores y las posiciones de derivación para ciertos de los haptenos descritos en la presente invención y para ciertos de los inmunógenos y conjugados:

TABLA 1

*Estructuras químicas de ciertos haptenos derivados de fentanilo y de su metabolito, norfentanilo*

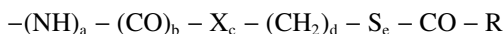
DERIVADOS	$Z_1$	$Z_2$	$Z_4$
HAPTENO A	H		
HAPTENO B	H		
HAPTENO C		H	
HAPTENO D	$-CO_2H$	H	
HAPTENO E		H	
HAPTENO G	H		

## ES 2 284 783 T3

Preferiblemente, el reticulador de  $Z_2$  está en la posición para.

Preferiblemente, el reticulador de  $Z_1$ ,  $Z_2$  o  $Z_4$  termina, en su extremo libre antes del acoplamiento al material portador que confiere antigenicidad o la unión al agente marcador para formar el inmunógeno o el conjugado, respectivamente, con  $-\text{CO}-\text{R}$ , en el que R es hidroxilo o un resto alquilo de cadena corta de cadena lineal o ramificada. Por “alquilo de cadena corta” se entiende un resto  $\text{C}_{1-5}$ . Más preferiblemente, el resto alquilo de cadena corta es un resto de cadena lineal. Aún más preferiblemente, el resto alquilo de cadena corta es un resto  $\text{C}_{1-2}$ , preferiblemente un resto alquilo de cadena lineal  $\text{C}_{1-2}$ .

Más preferiblemente, el reticulador de  $Z_1$ ,  $Z_2$  o  $Z_4$  antes del acoplamiento al material portador que confiere antigenicidad o la unión al agente marcador para formar el inmunógeno o el conjugado, respectivamente, comprende:



en donde a es 0 ó 1; b es 0 ó 1; X es oxígeno o azufre; c es 0 ó 1; d se selecciona de los números enteros 1-5, e es 0 ó 1 y R es un resto alquilo de cadena corta, preferiblemente un resto alquilo de cadena lineal o ramificada  $\text{C}_{1-5}$ , o un resto hidroxilo. Más preferiblemente, el resto alquilo es un resto de cadena lineal  $\text{C}_{1-5}$ . Aún más preferiblemente, el resto alquilo es un resto de cadena lineal  $\text{C}_{1-2}$ . Lo más preferiblemente, el resto alquilo es metilo.

La última condición, en su aspecto más amplio, para un inmunógeno o conjugado de la presente invención, a saber, que el reticulador  $Z_1$  no sea carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) conectado covalentemente bien a un material portador que confiere antigenicidad o bien a un agente marcador detectable, respectivamente, significa que la fórmula del reticulador mencionada anteriormente excluye un reticulador en el que a, b, c, d y e sean 0 y R sea hidroxilo, cuando  $Z_1$  sea el reticulador.

Preferiblemente, cuando e es 1, c es 0.

Preferiblemente, a es 0; b es 0 y c es 0. Más preferiblemente, d es 0; e es 1 y R es metilo o, alternativamente, d es 1; e es 0 y R es hidroxilo. Más preferiblemente,  $Z_1$  o  $Z_4$  es tal reticulador. Alternativamente,  $Z_2$  podría ser tal reticulador.

Alternativamente, a es 1; b es 1; c es 0 y d es 2. Preferiblemente, e es 1 y R es metilo o, alternativamente, e es 0 y R es hidroxilo. Más preferiblemente,  $Z_2$  es tal reticulador en una posición orto, para o meta, preferiblemente una posición para. Alternativamente,  $Z_1$  o  $Z_4$  podrían ser tal reticulador.

Además, alternativamente, a es 0; b es 0; e es 0; X es O y c es 1. Preferiblemente, d es 3 y R es hidroxilo.  $Z_1$ ,  $Z_2$  o  $Z_4$  podría ser tal reticulador.

La invención proporciona además un procedimiento para preparar los anticuerpos, comprendiendo el procedimiento las etapas de inmunizar a un animal, preferiblemente un animal vertebrado, lo más preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno de acuerdo con la presente invención, y recoger el suero resultante del animal inmunizado. Preferiblemente, el procedimiento comprende además fijar dichos anticuerpos séricos a un sustrato de apoyo, preferiblemente un soporte sólido, lo más preferiblemente un soporte sólido de poliestireno. Los anticuerpos preparados de acuerdo con este procedimiento son policlonales.

En un aspecto adicional más, la presente invención trata de anticuerpos producidos contra el inmunógeno de la presente invención, siendo capaces los anticuerpos de unirse a al menos un epítipo estructural de un metabolito de fentanilo o de un metabolito de sus análogos. Preferiblemente, el al menos un epítipo estructural comprende la estructura N-fenil-N-(4-piperidinil)amínica del fentanilo. Más preferiblemente, los anticuerpos se fijan sobre un sustrato de apoyo.

La invención trata preferiblemente de la producción de antisueros policlonales ávidos para metabolitos de fentanilo y para metabolitos de sus análogos, antisueros que, lo más preferiblemente, también exhiben alguna reactividad cruzada con fentanilo y sus análogos.

En un aspecto adicional más, la presente invención comprende un método para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo y metabolitos de análogos de fentanilo en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con el conjugado de la presente invención, o una mezcla del mismo, y con anticuerpos de la presente invención, o una mezcla de los mismos; detectar, o determinar la cantidad de, conjugado unido y deducir de una curva de calibración la presencia, o la cantidad, de metabolitos de fentanilo y metabolitos de análogos de fentanilo en la muestra.

En un aspecto adicional, la invención incluye un estuche para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo y metabolitos de análogos de fentanilo, incluyendo el estuche el conjugado de la presente invención, o una mezcla de los mismos, y los anticuerpos de la presente invención, o una mezcla de los mismos. El estuche puede incluir opcionalmente instrucciones para el uso de dicho conjugado y dichos anticuerpos para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo y metabolitos de análogos de fentanilo en una muestra.

## ES 2 284 783 T3

Preferiblemente, la muestra es una solución, tal como un fluido biológico. Más preferiblemente, la muestra es suero u orina. Lo más preferiblemente, la muestra es una solución o una suspensión procedente de un paciente humano.

Un método o estuche puede comprender un conjugado, o una mezcla de los mismos, en donde el o cada conjugado se prepara a partir de un hapteno en el que uno de  $Z_1$ ,  $Z_2$  o  $Z_4$ , preferiblemente uno de  $Z_2$  o  $Z_4$ , es un reticulador, y un anticuerpo, o una mezcla de los mismos, en donde el o cada anticuerpo se genera para un hapteno, en el que uno de  $Z_1$ ,  $Z_2$  o  $Z_4$ , preferiblemente uno de  $Z_1$  o  $Z_2$ , es un reticulador. Los haptenos constituyentes respectivos pueden ser idénticos o los haptenos constituyentes respectivos pueden derivarse en la misma posición pero usando diferentes reticuladores, prefiriéndose lo último. Sin embargo, se prefiere que los haptenos constituyentes respectivos se deriven en diferentes posiciones, bien usando los mismos reticuladores o bien usando reticuladores diferentes. Se prefiere más un inmunógeno derivado de un hapteno en el que  $Z_2$  es un reticulador para el uso en un método o estuche con un conjugado derivado de un hapteno en el que uno de  $Z_2$  o  $Z_4$  es un reticulador, en el que los reticuladores respectivos (del inmunógeno y el conjugado) son iguales o, más preferiblemente, diferentes. Se prefiere un inmunógeno derivado de un hapteno en el que  $Z_2$  sea un reticulador para el uso en un método o estuche con el conjugado derivado de un hapteno en el que  $Z_4$  sea un reticulador, en el que los reticuladores respectivos (del inmunógeno y el conjugado) son iguales o, más preferiblemente, diferentes.

Se contempla igualmente un conjugado derivado de un hapteno en el que  $Z_2$  o  $Z_4$  es un reticulador para el uso en un método o estuche de la presente invención con un inmunógeno derivado de un hapteno en el que uno de  $Z_1$ ,  $Z_2$  o  $Z_4$  es un reticulador, en el que los reticuladores respectivos (del inmunógeno y el conjugado) son iguales o, más preferiblemente, diferentes. Se prefiere aún más un conjugado derivado de un hapteno en el que  $Z_2$  o  $Z_4$  es un reticulador para el uso en un método o estuche de acuerdo con la presente invención, con un inmunógeno derivado de un hapteno en el que uno de  $Z_1$  o  $Z_2$  es un reticulador. Lo que más se prefiere es un conjugado derivado de un hapteno en el que  $Z_2$  o  $Z_4$  es un reticulador para el uso en un método o estuche de la presente invención con un inmunógeno derivado de un hapteno en el que  $Z_2$  es un reticulador, en el que los reticuladores respectivos (del inmunógeno y el conjugado) son iguales o, más preferiblemente, diferentes.

En un aspecto adicional, la presente invención implica el uso de los conjugados de acuerdo con la presente invención, o una mezcla de los mismos, con los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, o una mezcla de los mismos, para probar muestras tales como fluidos biológicos, para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo y metabolitos de análogos de fentanilo.

La presente invención se refiere a nuevos haptenos que se emplean en la preparación de nuevos inmunógenos mediante conjugación con materiales portadores que confieren antigenicidad convencionales. El inmunógeno resultante se administra a continuación a animales, preferiblemente huéspedes vertebrados, lo más preferiblemente huéspedes humanos, para provocar la producción de antisueros policlonales ávidos que a continuación se usan para desarrollar un inmunoensayo genérico para metabolitos de fentanilo y para metabolitos de análogos de fentanilo, empleando un conjugado (hapteno-agente marcador detectable) como el reactivo de detección.

El centro de atención es la preparación de anticuerpos específicos para metabolitos de fentanilo y para metabolitos de análogos de fentanilo. Para alcanzar tal especificidad amplia, los haptenos e inmunógenos se generan mediante modificación de fentanilo usando  $Z_1$  o  $Z_2$  como el reticulador, y mediante la modificación de norfentanilo usando  $Z_4$  como el reticulador.

### 45 *Preparación de Haptenos*

La preparación de los haptenos A y B se realiza de acuerdo con el esquema de reacción 1 indicado en la Figura 1. La preparación de los haptenos C, D y E se realiza de acuerdo con el esquema de reacción 2 indicado en la Figura 2. La preparación del hapteno F y el inmunógeno F se realiza de acuerdo con los esquemas de reacción 3 y 4 indicados en las Figuras 3 y 4 y la preparación del hapteno G y el inmunógeno G se realiza de acuerdo con el esquema de reacción 5 indicado en la Figura 5.

En referencia a la Figura 1, los haptenos N-[1-(p-acetilpropionamido)fenetil-4-piperidinil]-N-fenilpropionamida (A) y N-[1-(p-succinamido)fenetil-4-piperidinil]-N-fenilpropionamida (B) se preparan de acuerdo con el esquema de reacción 1. Una reacción de condensación entre anilina y N-metil-4-piperidona, a través de la formación de base de Schiff, en presencia de 1,2-dicloroetano, ácido acético y  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , da como resultado la producción del compuesto 1. Este compuesto reacciona con anhídrido propiónico, en presencia de tolueno y bajo reflujo, para producir el compuesto 2. El norfentanilo (compuesto 4) se prepara mediante N-desmetilación del compuesto 2, en un procedimiento en dos etapas, usando en la primera etapa cloroformiato de 1-cloroetilo ( $\text{ClCO}_2\text{CHClCH}_3$ ) en presencia de 1,2-dicloroetano, bajo reflujo durante 2 horas y, en la segunda etapa, metanol. La reacción del compuesto 4 con bromuro de p-nitrofenetilo en presencia de 4-metil-2-pentanona y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  bajo reflujo, seguido por reducción del grupo nitro hasta un grupo amino usando Pd-C en presencia de  $\text{HCOONH}_4$  y  $\text{CH}_3\text{OH}$ , da como resultado la producción del compuesto intermedio 6. El hapteno A se produce mediante la reacción del compuesto 6 con 3-(acetiltio)propionato de N-succinimidilo (SATP) en presencia de EDPA y dioxano y el hapteno B se produce mediante la reacción del compuesto 6 con anhídrido succínico.

En referencia a la Figura 2, los haptenos N-(1-fenetil-4-piperidinil)-N-fenil(S-acetilpropionamida) (C), N-(1-fenetil-4-piperidinil)-N-fenilsuccinamida (D) y N-(1-fenetil-4-piperidinil)-N-fenilglutaramida (E) se preparan de acuer-

## ES 2 284 783 T3

do con el esquema de reacción 2. El despropionilfentanilo (compuesto 7) se prepara mediante la reacción de 1-fenetil-4-piperidona con anilina seguida por la reducción con la base de Schiff. El compuesto producido se hace reaccionar a continuación con 3-(acetiltio)propionato de N-succinimidilo (SATP) en presencia de EDPA y dioxano para dar el hapteno C, con anhídrido succínico para dar el hapteno D o con anhídrido glutárico para dar el hapteno E.

5 En referencia a las Figuras 3 y 4, antes de la preparación del hapteno N-(1-fenetil-4-piperidinil)-N-(*p*-O-carboxipropil)fenilpropionamida (F), se genera [etil-*p*-(O-carboxipropil)]anilina (compuesto 9) de acuerdo con el esquema de reacción 3 de la Figura 3. Se alquila *p*-nitrofenol con 4-bromobutirato de etilo en presencia de hidruro sódico para producir el compuesto 8. El grupo nitro del compuesto 8 se reduce a continuación hasta un grupo amino usando Pd-  
10 C, dando como resultado la producción del compuesto 9.

Se prepara N-(1-fenetil-4-piperidinil)-N-(*p*-O-carboxipropil)-fenilpropionamida (hapteno F) en tres etapas de acuerdo con el esquema de reacción 4 de la Figura 4.

15 N-(1-fenetil)-4-piperidona se hace reaccionar con [etil-*p*-(O-carboxipropil)]anilina (compuesto 9) en 1,2-dicloroetano, en presencia de triacetoxiborohidruro sódico y ácido acético, para producir el compuesto 10. El compuesto 10 reacciona con anhídrido propiónico en tolueno bajo reflujo para dar el compuesto 11. El hapteno F se produce mediante saponificación del compuesto 11 con hidróxido sódico 2N en metanol.

20 En referencia a la Figura 5, el hapteno N-(1-carboximetil-4-piperidinil)-N-fenilpropionamida (G) se prepara en cuatro etapas de acuerdo con el esquema de reacción 5. La reacción de monohidrocloreto de monohidrato de 4-piperidona con bromoacetato de etilo en presencia de hidruro sódico en DMF da etil-N-carboximetil-4-piperidona (compuesto 12). El compuesto 12 se hace reaccionar a continuación con anilina en presencia de triacetoxiborohidruro sódico y ácido acético para producir N-(etil-1-carboximetil-4-piperidinil)-N-fenilalanina (compuesto 13). El compuesto 13 se trata con anhídrido propiónico en tolueno bajo reflujo para dar el compuesto 14. El hapteno G se produce mediante saponificación del compuesto 14 con hidróxido sódico (2N) en metanol.

### *Preparación de Inmunógenos y Conjugados*

30 Aunque los haptenos de fentanilo proporcionan epítopos estructurales definidos, no son por sí mismo inmunogénicos y por lo tanto necesitan conjugarse a material portador, lo que provocará una respuesta inmunogénica cuando se inyectan en un animal huésped. Materiales portadores adecuados incluyen proteínas tales como albúminas, proteínas séricas, por ejemplo globulinas, proteínas del cristalino ocular y lipoproteínas. Portadores proteínicos ilustrativos incluyen albúmina de suero bovino, ovalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, globulina que se une a tiroxina, hemocianina de lapa de ojo de cerradura, etc. Alternativamente, pueden emplearse poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, como también otros materiales polímeros sintéticos o naturales que tienen grupos funcionales reactivos. En particular, carbohidratos, levaduras o polisacáridos pueden conjugarse al hapteno para producir un inmunógeno.

40 Cada hapteno también puede conectarse covalentemente a un grupo marcador tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o un marcador radiactivo para producir conjugados (también conocidos como reactivos de detección) para el uso en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o uno de sus derivados.

45 Para confirmar que se ha alcanzado la conjugación adecuada del hapteno al material portador, antes de la inmunización, cada inmunógeno se evalúa usando espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láserica UV asistida por matriz (MALDI-TOF MS). En el caso del material portador preferido, albúmina de suero bovino, se prefiere un mínimo de 6 moléculas de hapteno por portador.

50 Al preparar conjugados o inmunógenos con haptenos en los que *e*, en el reticulador, es 1, tales como, por ejemplo, los haptenos A y C, los grupos maleimida, halo, mercaptopiridilo o vinilsulfona deben introducirse en primer lugar en el agente marcador o el material portador, respectivamente, usando conectores heterobifuncionales tales como, pero no limitados a: éster de N-( $\gamma$ -maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBS); 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC); (m-maleimidobenzoil)-N-hidroxisuccinimida (MBS); 4-(*p*-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB); (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB); bromoacetilglicin-N-hidroxisuccinimida; 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP); vinilsulfona (Pierce Chemical Company, USA). El agente marcador o material portador así modificado puede conjugarse a continuación a través de los grupos tiol en haptenos en los que *e* es 1, tales como los haptenos A y C. Para haptenos en los que *e*, en el reticulador, es 0, tales como los haptenos B, D, E, F y G, la conjugación se realiza sin modificación previa del agente marcador o el material  
60 portador, según sea apropiado, usando métodos estándar de conjugación tales como EDC o anhídrido mixto.

### *Preparación de Antisueros*

65 Para generar antisueros policlonales, el inmunógeno se mezcla con adyuvante de Freund y la mezcla se inyecta en un animal huésped, tal como un conejo, una oveja, un ratón, una cobaya o un caballo. Se realizan inyecciones adicionales (refuerzos) y el suero se muestra para la evaluación de la concentración de anticuerpos. Cuando se ha alcanzado la concentración óptima, a continuación se extrae sangre del animal huésped para dar un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de anticuerpo requerido depende de la aplicación pretendida. Para

## ES 2 284 783 T3

muchos propósitos, no hay requerimiento en absoluto de purificación, sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo ha de inmovilizarse sobre un soporte sólido, pueden adoptarse etapas de purificación para retirar material no deseado y eliminar la unión no específica.

5 Los anticuerpos específicos de la presente invención son útiles como reactivos en ensayos bioquímicos para la detección, o para la determinación de la cantidad de, metabolitos de fentanilo y metabolitos de sus análogos en fluidos biológicos.

10 En la siguiente tabla, se indican los resultados de datos característicos para compuestos preparados en los siguientes Ejemplos 4, 6-11 y 13-15:

Compuesto	Punto de Fusión (°C)	FT IR (KBr, Reflectancia Difusa, cm <sup>-1</sup> )
Ejemplo 6	154-157	3479,64, 3360,85, 1648,53 y 1594,23
Ejemplo 7 (Hapteno A)	164-167	3322,61, 1687,21, 1627,29 y 1594,98
Ejemplo 4	94-96	3426,96, 1648,67 y 1594,62
Ejemplo 9	92-94	3286,45, 1601,08
Ejemplo 8 (Hapteno B)	222-225	3244,1, 3180,1, 1677,7,1648,7 y 1597,1
Ejemplo 10 (Hapteno C)		1687,02, 1627,42 y 1536,36
Ejemplo 11 (Hapteno D)	198-202	1714,06,1650,94 y 1595
Ejemplo 11 (Hapteno E)	141-142	3442,02, 1654,13 y 1596,14
Ejemplo 13	198-200	3330,98, 1735,92, 1614,7 y 1514,78
Ejemplo 14	183-185	1730,99, 1654,98 y 1509,46
Ejemplo 15 (Hapteno F)	113 (Descomp)	3228, 1716,1, 1647,9 y 1510

### *Procedimiento General para el Análisis por MALDI-TOF de Inmunógenos*

55 Se realizó espectrometría de masas MALDI-TOF usando un espectrómetro de masas de desorción láserica Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Una parte alícuota de cada muestra que había de analizarse se diluyó en ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1% para crear soluciones de muestra de 1 mg/ml. Se analizaron partes alícuotas (1 µl) usando una matriz de ácido sinapínico y se usó albúmina de suero bovino (Fluka) como un calibrador externo. La Figura 6 de los dibujos adjuntos muestra el análisis para material portador de BSA. Como se observará, estaba presente una señal principal que indica una masa protonada media para esta muestra de m/z 66.525. La señal de m/z 33.273 está de acuerdo con el componente principal en una forma doblemente cargada y se observaron señales adicionales incluyendo aquella en m/z 13.641.

65 En los siguientes ejemplos, todos los porcentajes son v/v a no ser que se especifique otra cosa.

## ES 2 284 783 T3

### Ejemplo 1: Esquema de Reacción 1

#### *Preparación de N-(1-metil-4-(fenolamina)piperidina (Compuesto 1)*

5 A una solución de 4-N-metil-1-piperidona (7 g, 0,0062 moles) en 100 ml de 1,2-dicloroetano anhidro se añadieron anilina (12,7 g, 0,14 moles) y ácido acético (4 ml), seguido por triacetoxiborohidruro sódico (13,1 g, 0,062 moles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche.

Después de la evaporación del disolvente bajo presión reducida, se añadió agua (100 ml) y la solución se alcalinizó  
10 añadiendo NaOH (1 N), hasta pH 9. La solución se extrajo a continuación usando tolueno (2 x 100 ml), las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (150 ml), salmuera (50 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se cromatógrafió (gel de sílice, MeOH al 5%/cloroformo) para dar 9,4 g ((80% de rendimiento) de compuesto 1 como un sólido blanco después de la recristalización en acetato de etilo.

### 15 Ejemplo 2: Esquema de Reacción 1

#### *Preparación de N-(1-metil-4-piperidinil)-N-fenilpropionamida (Compuesto 2)*

A una solución del compuesto 1 del Ejemplo 1 (9,0 g, 0,047 moles) en tolueno anhidro (150 ml) se añadió anhídrido  
20 propiónico (15,4 g, 0,118 moles). La mezcla se agitó durante la noche a reflujo. Los disolventes se retiraron a vacío y el residuo se recristalizó en acetato de etilo/hexano para dar 10 g de compuesto 2 como un sólido blanco (86% de rendimiento).

### Ejemplo 3: Esquema de Reacción 1

25

#### *Preparación de N-[1-(1'-etilcloroformiato)-4-piperidinil]-N-fenilpropionamida (Compuesto 3)*

10 g (0,04 moles) de compuesto 2 del Ejemplo 2 se disolvieron en 1,2-dicloroetano anhidro (100 ml), bajo una  
30 atmósfera de nitrógeno, y se enfriaron hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadió a esta solución, gota a gota, cloroformiato de 1-cloroetilo (6,6 g, 0,046 moles) y la solución se calentó a reflujo durante 2 horas (la cromatografía en capa fina indicaba cuándo era completa la reacción). La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y los disolventes se retiraron bajo presión reducida. El residuo oleoso viscoso se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo al 10%/n-hexano al 90%) para dar el compuesto del título como un sólido amorfo blanco (10 g, 74% de rendimiento).

35

### Ejemplo 4: Esquema de Reacción 1

#### *Preparación de norfentanilo (Compuesto 4)*

40 10 g (0,03 moles) de compuesto 3 del Ejemplo 3 se disolvieron en metanol anhidro (150 ml) y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. La solución se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto del título como un polvo blanco con rendimiento cuantitativo.

### Ejemplo 5: Esquema de Reacción 1

45

#### *Preparación de N-[1-(p-nitrofenetil)-4-piperidinil]-N-fenilpropionamida (Compuesto 5)*

Una suspensión de norfentanilo del Ejemplo 4 (6,71 g, 0,029 moles), bromuro de p-nitrofenetilo (7,178 g, 0,0372  
50 moles), carbonato potásico (19 g, 0,14 moles) y unos pocos cristales de yoduro sódico en 4-metil-2-pentanona (200 ml) se agitó durante la noche a reflujo, bajo nitrógeno. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el precipitado se retiró mediante filtración y la solución se concentró bajo presión reducida. El residuo oscuro se disolvió en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua (2 x 100 ml), se secó sobre sulfato sódico, se filtró y el disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, MeOH al 10%/CHCl<sub>3</sub> al 90% v/v) para dar el compuesto del título como un sólido amarillo (5,33 g, 56% de rendimiento).

55

### Ejemplo 6: Esquema de Reacción 1

#### *Preparación de N-[1-(p-aminofenetil)-4-piperidini]-N-fenilpropionamida (Compuesto 6)*

60 A una solución que se agita de compuesto 5 del Ejemplo 5 (5 g, 0,013 moles) en metanol anhidro (200 ml) se añadió, bajo una atmósfera de nitrógeno, Pd-C al 10% (650 mg) seguido por formiato amónico (5 g, 0,063 moles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y se filtró a través de una columna corta de Celite™ para retirar el catalizador. El disolvente se retiró bajo presión reducida y el residuo se recogió en agua (100 ml). La solución acuosa se alcalinizó mediante la adición de NaOH 1 N y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas se  
65 combinaron, se lavaron con agua (50 ml), salmuera (50 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La solución se concentró a continuación bajo presión reducida para producir el compuesto 6, un polvo blanco que exhibe una sola mancha en la cromatografía en capa fina (2,7 g, 60% de rendimiento).

## ES 2 284 783 T3

Los datos de NMR para el compuesto 6 se presentan en la Figura 13.

### Ejemplo 7: Esquema de Reacción 1

#### 5 Preparación de *N*-[1-(*p*-acetiltiopropionamido)fenetil-4-piperidinil]-*N*-fenilpropionamida (Hapteno A)

10 A una solución que se agita del compuesto 6 del Ejemplo 6 (1 g, 0,0028 moles) y 3-(acetiltio)propionato de *N*-succinimidilo (SATP) (0,824 g, 0,00336 moles) en 25 ml de dioxano anhidro bajo nitrógeno se añadió diisopropiletilamina (EDPA) (0,72 ml, 0,0042 moles) y la mezcla se agitó y se calentó a 60°C durante 6 h. La mezcla se concentró a continuación a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando metanol al 10% v/v en cloroformo para producir el hapteno A, un sólido blanco que se recrystalizó en hexano/cloroformo en frío (835 mg, 62% de rendimiento).

Los datos de NMR para el hapteno A se presentan en la Figura 14.

### 15 Ejemplo 8: Esquema de Reacción 1

#### Preparación de *N*-[1-(*p*-succinamido)fenetil-4-piperidinil]-*N*-fenilpropionamida (Hapteno B)

20 A una solución del compuesto 6 del Ejemplo 6 (1 g, 0,0028 moles) en benceno anhidro (75 ml) se añadió anhídrido succínico (0,7007 g, 0,007 moles) y la mezcla se sometió a reflujo durante la noche. Se produjo un precipitado blanco y la TLC confirmaba que todo el material de partida se había consumido. El precipitado se separó por filtración, se lavó con benceno y se secó. Se recogió en agua (20 ml) y se calentó a 50°C durante una hora, se filtró y se secó a fondo. El sólido se recogió en acetonitrilo (20 ml) y se calentó a 60°C durante una hora, se filtró, se lavó con un poco de acetonitrilo frío y se secó bajo vacío durante la noche para dar el compuesto del título como un sólido blanco (0,82 g, 60% de rendimiento).

### Ejemplo 9: Esquema de Reacción 2

#### 30 Preparación de *N*-(1-fenetil-4-piperidinil)-fenilamina (despropionilfentanilo) (Compuesto 7)

35 El compuesto del título se preparó mediante el método esbozado en el Ejemplo 1 usando 1-fenetil-4-piperidona (5,3 g, 0,026 moles), anilina (5,01 ml, 0,55 moles), ácido acético (3 ml), 1,2-dicloroetano (100 ml) y triacetoxiborohidruro sódico (5,82 g, 0,027 moles). El compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (74% de rendimiento).

### Ejemplo 10: Esquema de Reacción 2

#### Preparación de *N*-(1-fenetil-4-piperidinil)-*N*-fenil-(*S*-acetiltiopropionamida) (Hapteno C)

40 El hapteno C se preparó mediante el mismo método esbozado en el Ejemplo 7 con 55% de rendimiento, es decir, con 3-(acetiltio)propionato de *N*-succinimidilo (SATP) en dioxano anhidro, a lo que se añade diisopropiletilamina (EDPA).

### Ejemplo 11: Esquema de Reacción 2

#### 45 Preparación de los Haptenos D y E

Los Haptenos D y E se prepararon mediante el mismo método esbozado en el Ejemplo 8. El Hapteno D se preparó usando anhídrido succínico (2 equivalentes) y el Hapteno E se preparó usando anhídrido glutárico (2 equivalentes).

### 50 Ejemplo 12: Esquema de Reacción 3

#### Preparación de [etil-*p*-(*O*-carboxipropil)]anilina (Compuesto 9)

55 A una suspensión de hidruro sódico (3,696 g, 0,11 moles) en 100 ml de dimetilformamida anhidra bajo nitrógeno se añadió gota a gota *p*-nitrofenol (13,911 g, 0,1 moles) en 100 ml de DMF. La mezcla se calentó a 60°C durante 1 h (sin desprendimiento de hidrógeno) y a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió gota a gota a esta mezcla 4-bromobutirato de etilo (23,4 g, 0,12 moles) en 50 ml de DMF durante un período de 15 minutos. La mezcla se calentó de nuevo a 60°C y se agitó durante 4 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, los disolventes se evaporaron bajo presión reducida. Se añadieron 150 ml de agua al producto en bruto que se extrajo a continuación usando acetato de etilo (2 x 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron y se filtraron. El disolvente se retiró a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido (hexano al 90%/acetato de etilo al 10% v/v) para dar 21,7 g (86% de rendimiento) de [etil-*p*-(*O*-carboxipropil)-1-nitrofenilo] (compuesto 8) como un sólido blanco.

65 A una solución que se agita del compuesto 8 (0,87 g, 0,039 moles) en 400 ml de metanol anhidro se añadió, bajo nitrógeno, Pd-C (10%) (1,95 g) seguido por formiato amónico (15 g, 0,189 moles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual la TLC confirmaba que todos los materiales de partida se habían consu-

## ES 2 284 783 T3

mido. El catalizador se retiró mediante filtración sobre Celite™. El disolvente se retiró a continuación bajo vacío y el residuo se recogió en agua (150 ml). La solución acuosa se alcalinizó mediante la adición de hidróxido sódico 2 N y se extrajo mediante éter (2 x 150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (100 ml), salmuera (100 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La solución se concentró a continuación bajo presión reducida para dar un sólido blanco de compuesto 9 (6,52 g, 75% de rendimiento).

Ejemplo 13: Esquema de Reacción 4

*Preparación de N-[(1-fenetil-4-piperidinil)-N-(etil-p-(O-carboxipropil))]fenilamina (Compuesto 10)*

El compuesto 10 se preparó de la misma manera que se esboza en el Ejemplo 1 usando el compuesto 9 en lugar de anilina y 1-fenetil-4-piperidona, en presencia de 1,2-dicloroetano anhidro, ácido acético y triacetoxiborohidruro sódico. El compuesto 10 se obtuvo en forma cristalina (65% de rendimiento).

Ejemplo 14: Esquema de Reacción 4

*Preparación de [etil-p-(O-carboxipropil)]fentanilo (Compuesto 11)*

El compuesto del título se preparó de la misma manera que se esboza en el Ejemplo 2, usando el compuesto 10 en tolueno anhidro y anhídrido propiónico bajo reflujo. El compuesto del título 11 se obtuvo como un sólido blanco con 80% de rendimiento.

Ejemplo 15: Esquema de Reacción 4

*Preparación de p-[(O-carboxipropil)]fentanilo (Hapteno F)*

A una solución de compuesto 11 (3,5 g, 7,5 mmol) en metanol (80 ml) se añadió hidróxido sódico 2 N (20 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas (la TLC mostraba que no quedaban materiales de partida). La mezcla se redujo hasta sequedad a vacío, se añadió agua (50 ml) y el pH de la solución resultante se ajustó hasta 6. La solución se extrajo con cloroformo (2 x 100 ml), los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (1 x 50 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío. El sólido obtenido se trituró con éter, se filtró y se secó durante la noche para dar 2,1 g (64% de rendimiento) del hapteno F.

Los datos de NMR para el hapteno F se presentan en la Figura 15.

Ejemplo 16: Esquema de Reacción 5

*Preparación de (1-carboximetil)-4-piperidona de etilo (Compuesto 12)*

A una solución de monohidrocloreto de monohidrato de 4-piperidona (12 g, 78,12 mmol) en dimetilformamida anhidra (120 ml) bajo nitrógeno se añadió, en pequeñas porciones, hidruro sódico [dispersión al 60% p/p en aceite mineral] (5,25 g, 156 mmol). Después de la adición completa, la mezcla se calentó a 60°C durante 1 hora (no se observó que se desprendiera hidrógeno gaseoso adicional), se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió gota a gota durante 15 minutos bromoacetato de etilo (19,6 g, 177 mmol) en DMF (50 ml). La mezcla resultante se calentó a 60°C durante la noche. Se añadieron unas pocas gotas de agua para extinguir la reacción y los disolventes se retiraron a vacío. Se añadió agua (100 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1 x 100 ml), salmuera (1 x 100 ml), se secaron sobre sulfato sódico y el disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (acetato de etilo al 50%/hexano al 50% v/v) para dar el compuesto del título 12 como un aceite transparente (3,4 g, 65% de rendimiento).

Ejemplo 17: Esquema de Reacción 5

*Preparación de N-[etil-1-carboximetil]-4-(fenilamino)]piperidina (Compuesto 13)*

El compuesto 13 se preparó de la misma manera que se esboza en el Ejemplo 1, usando etil(1-carboximetil)-4-piperidona (compuesto 12) (7,4 g, 0,04 moles) y anilina (8,2 g, 0,14 moles) en 1,2-dicloroetano (120 ml) en presencia de triacetoxiborohidruro sódico (8,5 g, 0,04 moles) y ácido acético (4 ml). El compuesto del título se obtuvo después de la purificación mediante cromatografía en columna (gel de sílice, metanol al 10% v/v en cloroformo) (8,4 g, 80% de rendimiento).

Ejemplo 18: Esquema de Reacción 5

*Preparación de N-(etil-carboximetil)-norfentanilo (Compuesto 14)*

El compuesto 14 se preparó a partir del compuesto 13 (7,86 g, 0,03 moles) en tolueno anhidro y anhídrido propiónico (8,59 g, 0,066 moles) usando el mismo método que se da en el Ejemplo 2. El compuesto 14 se obtuvo después de la recristalización en acetato de etilo/hexano (7,15 g, 75% de rendimiento).

## ES 2 284 783 T3

### Ejemplo 19: Esquema de Reacción 5

#### *Preparación de N-(carboximetil)-norfentanilo (Hapteno G)*

5 A una solución de compuesto 14 (3,78 g, 10 mmol) en metanol (80 ml) se añadió hidróxido sódico 2 N (20 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas (la TLC mostraba que no estaban presentes materiales de partida). La mezcla se redujo hasta sequedad, se añadió agua (50 ml) y el pH se ajustó hasta 5 mediante la adición de HCl 1N. El precipitado que se formaba se recogió mediante filtración, se lavó con un poco de agua fría y se secó durante la noche en presencia de pentóxido de fósforo. El sólido blanco obtenido corresponde al hapteno G (1,38 g, 10  
10 50% de rendimiento).

Los datos de NMR para el hapteno G se presentan en la Figura 16.

### Ejemplo 20

#### *Preparación de albúmina de suero bovino (BSA) - bromoacetilglicina*

15 A una solución de BSA (1 g) en tampón de borato 0,1 M (pH 8,5, 45 ml), enfriada hasta 0°C, se añadió gota a gota N-succinimidilbromoacetilglicina (0,375 g, 0,13 mmol) en DMF (5 ml). Durante la adición el pH se mantuvo en 8. Después de la adición completa, el pH se estabilizó a 8 y la solución se agitó a 0°C durante 1 hora. El pH se ajustó a continuación hasta aproximadamente 7 y la solución se dializó durante la noche a 4°C frente a agua destilada (2 cambios). La solución se secó por congelación a continuación para dar aproximadamente 1 g de BSA modificada por bromoacetilglicina.

25 El análisis por MALDI-TOF (véase la Figura 7) muestra que estaba presente una señal principal que indica una masa protonada media para esta muestra de m/z 73.818. Las señales en m/z 24.564, 36.897 y 147.713 están de acuerdo con el componente principal en formas triplemente cargada, doblemente cargada y dímera, respectivamente. Se observaron señales adicionales incluyendo aquellas en m/z 14.927, 49.425 y 111.425.

30 Estos datos sugieren que 40,3 grupos lisina por molécula de BSA han sido modificados por la bromoacetilglicina.

### Ejemplo 21

#### *Producción del inmunógeno A usando BSA modificada con bromoacetilglicina*

35 El hapteno A (58,15 mg, 0,12 mmol) se disolvió en DMF anhidra (100  $\mu$ l) y a esta solución se añadió solución de hidroxilamina (900  $\mu$ l, PH 12). La mezcla se dejó reposar 10-15 minutos (la TLC mostraba la desaparición del Hapteno A y la formación de un nuevo compuesto de Rf inferior). Se añadió tampón de fosfato para extinguir la reacción y el pH se ajustó hasta 7 mediante la adición de HCl 0,05 N. Esta solución se añadió gota a gota a una solución de la BSA modificada del Ejemplo 20 (200 mg en 10 ml de agua) y la solución se agitó a 4°C durante la noche (protegida de la luz). La solución se dializó a continuación frente a agua destilada durante 24 horas (3 cambios) y se secó por congelación. Los resultados de MALDI (véase la Figura 8 de los dibujos adjuntos) mostraban que 12,5 moléculas de Hapteno A se habían conjugado a una molécula de BSA modificada. Específicamente, estaba presente una señal que indica una masa protonada media para esta muestra de m/z 79.795. La señal en m/z 39.759 está de acuerdo con el  
40 componente principal en forma doblemente cargada. Se observó una señal adicional en m/z 15.654.

### Ejemplo 22

#### *Producción del Inmunógeno G usando BSA modificada con bromoacetilglicina*

50 La conjugación se llevó a cabo mediante el método dado en el Ejemplo 21 usando el Hapteno C.

Los resultados de MALDI (véase la Figura 9 de los dibujos adjuntos) mostraban que 7,2 moléculas del hapteno C se habían conjugado a una molécula de BSA modificada. Específicamente, estaba presente una señal principal que indica una masa protonada media para esta muestra de m/z 76.770. La señal en m/z 38.367 está de acuerdo con el  
55 componente principal en forma doblemente cargada. Se observó una señal adicional en m/z 15.514.

### Ejemplo 23: Esquema de Reacción 4

#### *Producción del inmunógeno F usando BSA*

60 Se disolvieron 50 mg de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) en 600  $\mu$ l de agua y se añadieron inmediatamente a una solución de 100 mg de BSA (1,5  $\mu$ mol) en 4 ml de agua. El Hapteno F (19,7 mg, 45  $\mu$ mol) disuelto en 2 ml de DMF anhidra se añadió gota a gota, con agitación. Se añadieron 5 mg de sulfo-NHS y la solución resultante se incubó durante la noche a 37°C. La solución se dializó a continuación frente a 5 l de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, durante 24 horas a 4°C, con agitación.

## ES 2 284 783 T3

Los resultados de MALDI (véase la Figura 10 de los dibujos adjuntos) mostraban que 17,1 moléculas de Hapteno F se habían conjugado a una molécula de BSA. Específicamente, estaba presente una señal principal que indica una masa protonada media para esta muestra de  $m/z$  73.590. La señal en  $m/z$  36.870 está de acuerdo con el componente principal en una forma doblemente cargada. Se observaron señales adicionales incluyendo aquella en  $m/z$  14.177.

5

Ejemplo 24: Esquema de Reacción 5

*Producción del Inmunógeno G usando BSA*

10 Esta conjugación se realizó mediante el método esbozado en el Ejemplo 23 usando el Hapteno G (12,57 mg, 43  $\mu$ mol).

15 Los resultados de MALDI (véase la Figura 11 de los dibujos adjuntos) mostraban que 10,4 moléculas de Hapteno G se habían conjugado a una molécula de BSA. Específicamente, estaba presente una señal principal que indica una masa protonada media para esta muestra de  $m/z$  69.355. La señal en  $m/z$  34.971 está de acuerdo con un componente principal en una forma doblemente cargada. Se observaron señales adicionales incluyendo aquella en  $m/z$  13.924.

Ejemplo 25

20 *Conjugación de los Haptenos B y E al Agente Marcador (Peroxidasa de Rábano Picante (HRP))*

25 10 mg de EDC se disolvieron en 800  $\mu$ l de agua y se añadieron inmediatamente a una solución del hapteno (1 mg) en 200  $\mu$ l de DMF. La solución resultante se mezcló suavemente y a continuación se añadió una solución de HRP (20 mg) en 1 ml de agua. Después de mezclar, se añadieron 5 mg de sulfo-NHS y toda la reacción se incubó durante la noche a 37°C en la oscuridad. El conjugado resultante se purificó mediante el paso a través de dos columnas PD10 (Pharmacia Biotech), se eluyó con PBS 20 mM, pH 7,2, y a continuación se dializó durante la noche a 4°C frente a PBS 20 mM, pH 7,2.

Ejemplo 26

30

*Conjugación del Hapteno G al Agente Marcador (HRP)*

35 10  $\mu$ l de trietilamina (TEA) se añadieron a una solución del Hapteno G (1 mg) en 400  $\mu$ l de DMF y la solución resultante se mezcló durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a continuación 4  $\mu$ l de cloroformiato de isobutilo (BCF) y se dejaron reaccionar durante 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. El hapteno activado se añadió inmediatamente a una solución de HRP (20 mg) en 2 ml de agua y la reacción se incubó durante la noche, con mezcladura, a temperatura ambiente en la oscuridad. El conjugado resultante se purificó mediante el paso a través de dos columnas PD10 (Pharmacia Biotech), se eluyó con PBS 20 mM, pH 7,2, y a continuación se dializó durante la noche a 4°C frente a PBS 20 mM, pH 7,2.

40

Ejemplo 27

*Inmunización y Extracción de Sangre*

45 Una solución acuosa de cada uno de los inmunógenos preparados en los Ejemplos 21, 22, 23 y 24 se formuló con adyuvante completo de Freund (FCA) para formar una emulsión que consistía en 2 mg/ml de inmunógeno en FCA al 50% (v/v). Se inmunizaron tres ovejas con esta emulsión, inyectándose subcutáneamente 0,25 ml en cada una de cuatro zonas del costado de cada animal. Inmunizaciones subsiguientes (refuerzos) contenían 1 mg/ml de inmunógeno emulsificado en adyuvante incompleto de Freund (FIA) al 50% (v/v) y se administraron de la misma manera a intervalos mensuales durante un año. El muestreo de sangre tuvo lugar de 7 a 14 días después de cada refuerzo. Cada muestra se procesó para producir antisuero, que se purificó adicionalmente mediante precipitación con ácido caprílico y sulfato amónico para dar una fracción de inmunoglobulina G (IgG). La fracción de IgG se evaluó mediante ensayo en placa de microvaloración de ELISA competitivo, según se describe posteriormente.

55 Ejemplo 28

*Ensayos en placa de microvaloración de ELISA competitivos para norfentanilo y fentanilo*

60 (a) Los pocillos de una placa de microvaloración de poliestireno de 96 pocillos con unión potenciada se revistieron con la fracción de IgG del antisuero producido para el inmunógeno A (Hapteno A-BSA) (Ejemplo 21), diluida en Tris 10 mM, pH 8,5 (125  $\mu$ l/pocillo). La dilución de revestimiento de anticuerpo apropiada se determinó usando técnicas de cuadrículas de ELISA estándar. La placa se incubó durante 2 horas a 37°C, se lavó cuatro veces con solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 (TBST) y se secó por succión. Se prepararon soluciones estándar de fentanilo y norfentanilo en TBST a 1, 5, 10, 50 y 500 ng/ml y 25  $\mu$ l de cada una se añadió a los pocillos apropiados (véase la Figura 12). 100  $\mu$ l de conjugado B (hapteno B-HRP) (Ejemplo 25), diluido en tampón de Tris que contiene EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA, se añadieron a cada uno de los pocillos, según se muestra en la Figura 12. La adición apropiada del conjugado también se determinó usando técnicas de cuadrículas de ELISA estándar. La placa se incubó a 37°C durante 2 horas. El conjugado no unido en exceso se retiró lavando 6 veces durante un período

65

## ES 2 284 783 T3

de 10 minutos con TBST. 125  $\mu$ l de solución de sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) se añadieron a cada pocillo de la placa, que se incubó a continuación durante de 15 a 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se terminó mediante la adición de 125  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 M a cada pocillo. La absorbancia se midió a continuación a 450 nm usando un lector de placas de microvaloración. Los datos generados en el ensayo se presentan en la Tabla 1 posteriormente.

TABLA 1

*Datos generados a partir de un ensayo en placa de microvaloración competitivo para norfentanilo y fentanilo empleando antisuero producido para el inmunógeno A (hapteno A-BSA) (Ejemplo 21) y el conjugado B (hapteno B-HRP) como reactivo de detección (Ejemplo 25)*

Concentración Estándar ng/ml	Fentanilo		Norfentanilo	
	<i>A</i> <sub>450</sub>	%B/B <sub>0</sub>	<i>A</i> <sub>450</sub>	%B/B <sub>0</sub>
0	2,3		2,29	
0,05	2,07		2,18	94,94
0,1	1,84	80,2	2,11	91,83
0,5	1,26	54,91	1,94	84,57
1	0,87	38,01	1,77	77,27
5	0,27	11,74	1,37	59,8
25	0,08	3,68	0,76	33,32
250	0,08	3,53	0,24	10,57
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>0,61 ng/ml</b>		<b>9,07 ng/ml</b>	
<p><i>A</i><sub>450</sub> = absorbancia a 450 nm                      B = absorbancia a 450 nm a xng/ml de concentración estándar                      B<sub>0</sub> = absorbancia a 450 nm a 0 ng/ml de concentración estándar                      IC<sub>50</sub> = concentración estándar que produce 50% de B/B<sub>0</sub></p>				

## ES 2 284 783 T3

(b) De una manera similar a la descrita en el Ejemplo 28(a) y usando las mismas definiciones para  $A_{450}$ , B,  $B_0$  e  $IC_{50}$ , los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos se revistieron con la fracción de IgG del antisuero producido para el inmunógeno A (hapteno A-BSA) (Ejemplo 21) y el conjugado G (hapteno G-HRP) (Ejemplo 26) se detectó como reactivo de detección. Los datos generados se presentan en la Tabla 2 posteriormente.

5

TABLA 2

10

*Datos generados a partir de un ensayo en placa de microvaloración competitivo para norfentanilo y fentanilo empleando antisuero producido para el inmunógeno A (hapteno A-BSA) (Ejemplo 21) y el conjugado B (hapteno G-HRP) como reactivo de detección (Ejemplo 26)*

15

Concentración Estándar ng/ml	Fentanilo		Norfentanilo	
	$A_{450}$	%B/ $B_0$	$A_{450}$	%B/ $B_0$
0	1,99		1,94	
0,05	1,94	97,09	1,85	95,69
0,1	1,94	97,54	1,82	93,93
0,5	1,71	85,9	1,67	86,31
1	1,47	73,66	1,52	78,48
5	0,4	19,97	1,03	53,04
25	0,07	3,54	0,56	29,14
250	0,03	1,43	0,14	7,05
<b><math>IC_{50}</math></b>	<b>2,03 ng/ml</b>		<b>6,14 ng/ml</b>	

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 284 783 T3

(c) De una manera similar a la descrita en el Ejemplo 28(a), los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos se revistieron con la fracción de IgG del antisuero producido para el inmunógeno C (hapteno C-BSA) (Ejemplo 22) y el conjugado E (hapteno E-HRP) (Ejemplo 25) se emplea como reactivo de detección. Los datos generados se presentan en la Tabla 3 posteriormente.

TABLA 3

*Datos generados a partir de un ensayo en placa de microvaloración competitivo para norfentanilo y fentanilo empleando antisuero producido para el inmunógeno A (hapteno C-BSA) (Ejemplo 22) y el conjugado B (hapteno E-HRP) como reactivo de detección (Ejemplo 25)*

Concentración Estándar ng/ml	Fentanilo		Norfentanilo	
	$A_{450}$	%B/B <sub>0</sub>	$A_{450}$	%B/B <sub>0</sub>
0	2,3		2,2	
0,05	1,9	82,2	2,1	94,3
0,1	1,6	68,2	2,0	90,8
0,5	0,8	34,4	1,9	88,5
1	0,5	23,4	1,9	88,6
5	0,2	8,4	1,9	89,2
25	0,1	2,8	2,0	90,1
250	0,0	1,0	2,0	89,6
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>0,24 ng/ml</b>		<b>&gt;250 ng/ml</b>	

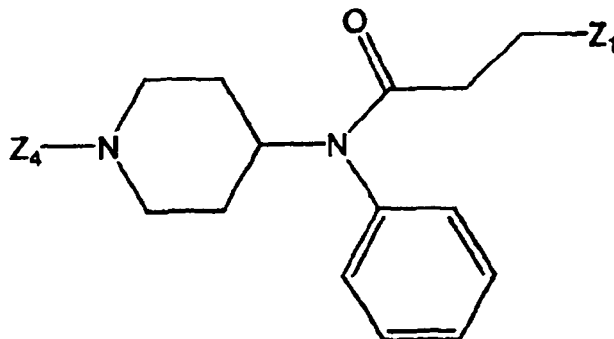
### Bibliografía

- Camu y otros; *Anesth. Analg.*; 61; pp657-61 (1982)
- Frincke, J.M. y Henderson, G.L.; *Drug Metab. Dispos.*; 8(6); pp425-7 (1980).
- Hammargren, W.R. y Henderson, G.L.; *Anal. Toxicol.*; 12; pp183-191 (1988).
- Henderson y otros; *Pharmacol. Exp. Ther.*; 192(2); pp489-96 (1975).
- Makowski y otros; *Annals of Clinical and Laboratory Science*; 25(2); pp169-177 (1995).
- McDonald y otros; *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*; 57(3); pp389-407 (1987).
- Meuldermans y otros; *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*; 257; pp4-19 (1982).
- Michiels y otros; *Eur. J. Clin. Pharmacol.*; 12(2); pp153-8 (1977).
- Ruangyuttikarn y otros; *J. Anal. Toxicol.*; 14; pp160-164 (1990).
- Silverstein y otros; *Anesthesia and Analgesia*; 76; pp618-621 (1993).
- Watts, V.W. y Caplan, Y. H.; *J. Anal. Toxicol.*; 14; pp266-272 (1990).

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno de la fórmula

5



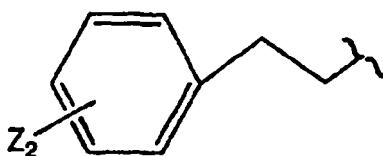
10

15

20

en la que  $Z_1$  es hidrógeno y  $Z_4$  se selecciona de un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad o

25



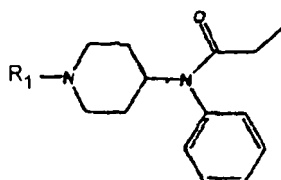
30

en la que  $Z_2$  es un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad en una posición orto, meta o para, con la condición de que el inmunógeno no sea un heterodímero de la fórmula:  $(BKAn)(X)(Y)$ ; donde BKAn es un péptido antagonista de bradiquinina;

35

en donde Y es:

40



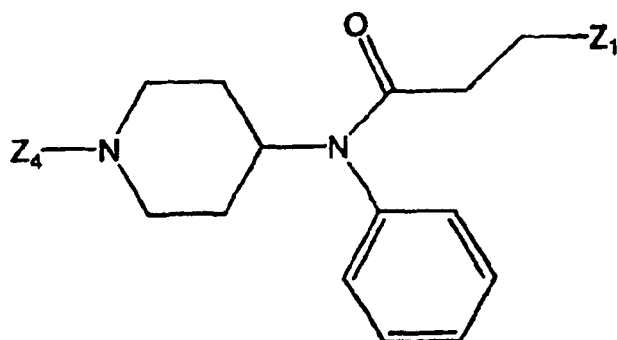
45

donde  $R_1$  es el grupo de conexión X de la fórmula  $CH_2CH_2(Phe)CH_2C(O)$ .

50

2. Un conjugado de la fórmula:

55



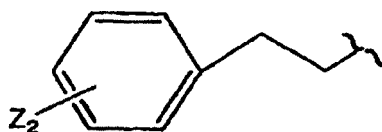
60

65

## ES 2 284 783 T3

en la que  $Z_1$  es hidrógeno;  $Z_4$  se selecciona de un reticulador unido covalentemente a un agente marcador que es detectable o

5

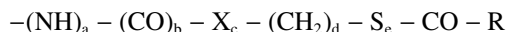


10 en la que  $Z_2$  es un reticulador unido covalentemente a un agente marcador que es detectable en una posición orto, meta o para.

15 3. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el reticulador de  $Z_2$  está en la posición para.

20 4. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reticulador termina, en su extremo libre antes del acoplamiento al material portador que confiere antigenicidad o la unión a un agente marcador para formar el inmunógeno o el conjugado, respectivamente, con  $-CO-R$ , en el que R es hidroxilo y un resto alquilo de cadena corta ( $C_{1-5}$ ), preferiblemente alquilo ( $C_{1-2}$ ).

25 5. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el reticulador, antes del acoplamiento al material portador que confiere antigenicidad o la unión a un agente marcador para formar el inmunógeno o el conjugado, respectivamente, comprende



25

30 en donde, independientemente, a es 0 ó 1; b es 0 ó 1; X es oxígeno o azufre; c es 0 ó 1; d se selecciona de los números enteros 1-5, e es 0 ó 1 y R es un resto alquilo de cadena corta ( $C_{1-5}$ ), preferiblemente un resto alquilo  $C_{1-2}$ , o un resto hidroxilo.

30

6. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que a es 1; b es 1; c es 0 y d es 2.

7. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en el que e es 1 y R es metilo.

35

8. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en el que e es 0 y R es hidroxilo.

9. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que  $Z_1$  es hidrógeno y el reticulador  $Z_2$  está en la posición para.

40

10. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que a es 0; b es 0 y c es 0.

11. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 10, en el que d es 0; e es 1 y R es metilo.

45

12. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 10, en el que d es 0 ó 1; e es 0 y R es hidroxilo.

13. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que  $Z_4$  es el reticulador.

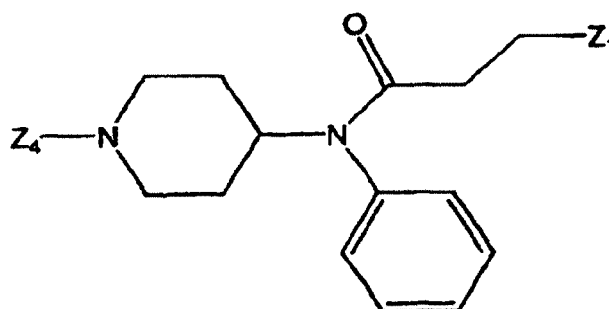
50

14. Un inmunógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 13, en el que el material portador que confiere antigenicidad se selecciona de una proteína, un fragmento proteínico, un polipéptido sintético y un polipéptido semisintético.

55

15. Anticuerpos producidos contra un inmunógeno seleccionado del grupo que comprende un inmunógeno de la fórmula:

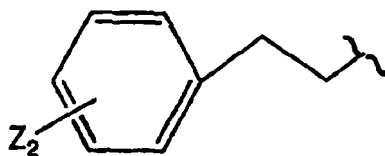
60



65

en la que  $Z_1$  es hidrógeno y  $Z_4$  se selecciona de un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad o

5



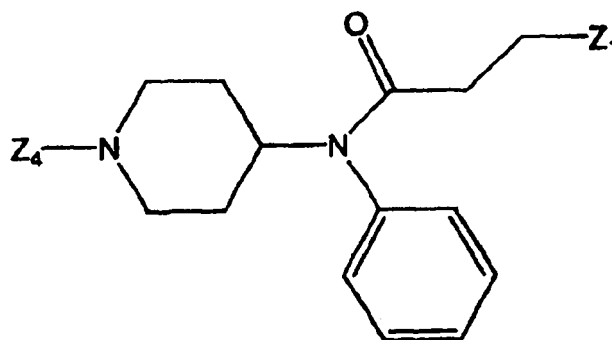
10

en la que  $Z_2$  es un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad en una posición orto, meta o para o un inmunógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14, en donde los anticuerpos son capaces de unirse a al menos un epítipo estructural de un metabolito de fentanilo o de un metabolito de un análogo de fentanilo.

15

16. Un procedimiento para preparar los anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 15, comprendiendo el procedimiento las etapas de inmunizar a un animal mediante la administración repetida del inmunógeno seleccionado del grupo que comprende el inmunógeno de la fórmula:

20



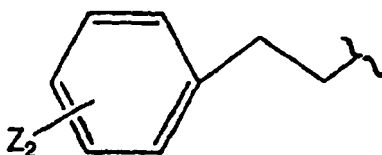
25

30

35

en la que  $Z_1$  es hidrógeno y  $Z_4$  se selecciona de un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad o

40



45

en la que  $Z_2$  es un reticulador acoplado a un material portador que confiere antigenicidad en una posición orto, meta o para o un inmunógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14, y recoger el suero resultante del animal inmunizado.

50

17. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en el que el agente marcador detectable se selecciona de una enzima, que es preferiblemente una peroxidasa, lo más preferiblemente una peroxidasa de rábano picante; una sustancia luminiscente, que se selecciona preferiblemente de una sustancia bioluminiscente, una sustancia quimioluminiscente o una sustancia fluorescente, o una mezcla de las mismas; y un sustancia radiactiva; o una mezcla de las mismas.

55

18. Un método para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo o de metabolitos de análogos de fentanilo en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 y 17, o una mezcla de los mismos, y con los anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 15 o una mezcla de los mismos; detectar, o determinar la cantidad de, conjugado unido; y deducir de una curva de calibración la presencia, o la cantidad de, metabolitos de fentanilo y metabolitos de análogos de fentanilo en la muestra.

60

19. Un estuche para detectar, o determinar la cantidad de, metabolitos de fentanilo o metabolitos de análogos de fentanilo, incluyendo el estuche un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 y 17 o una mezcla de los mismos los anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 15 o una mezcla de los mismos.

65

## ES 2 284 783 T3

20. Un método o un estuche de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, en el que los anticuerpos se producen contra un inmunógeno en el que  $Z_2$  es el reticulador.

5 21. Un método o un estuche de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que  $Z_4$  del conjugado es el reticulador.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

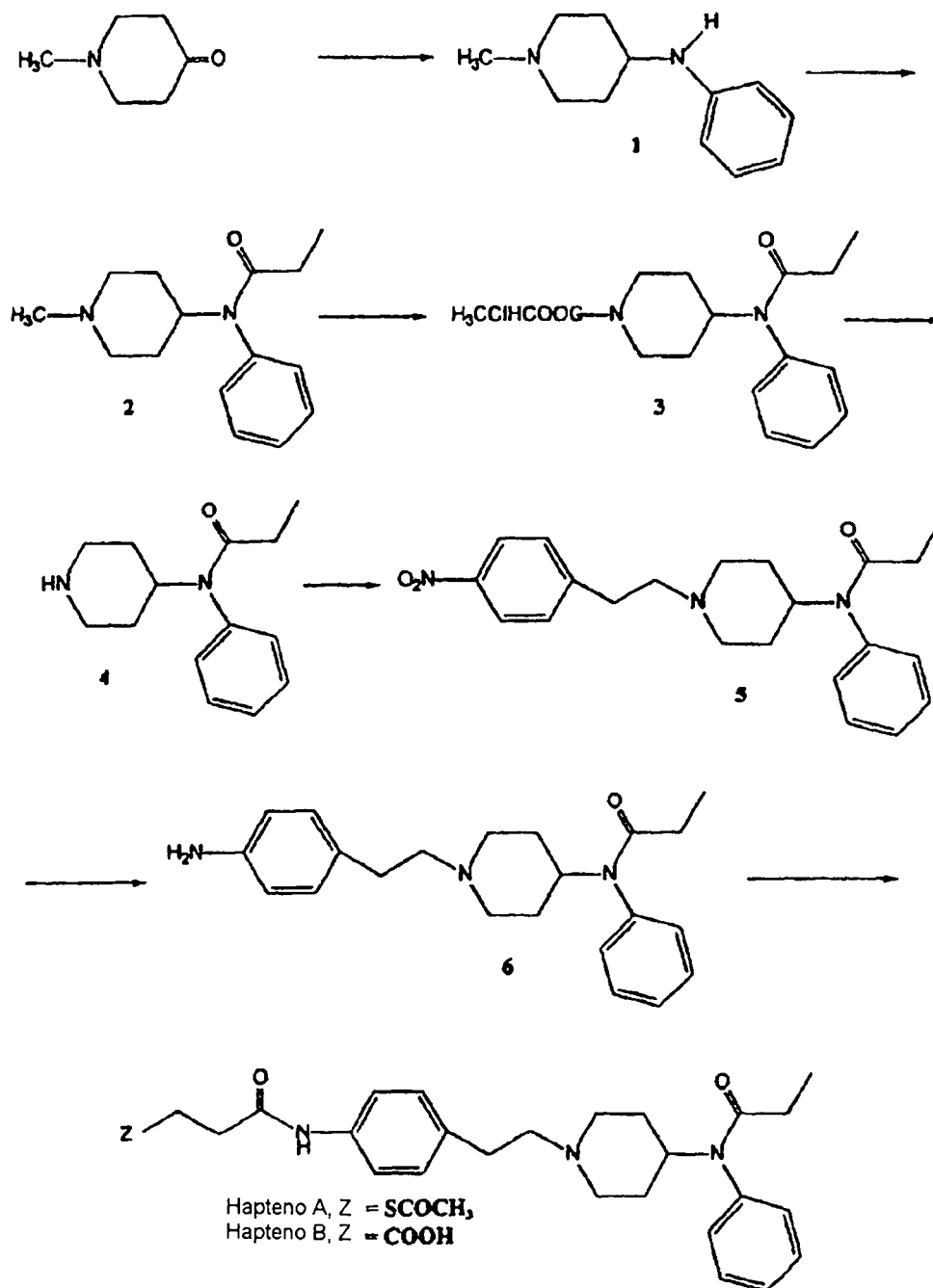


Figura 2

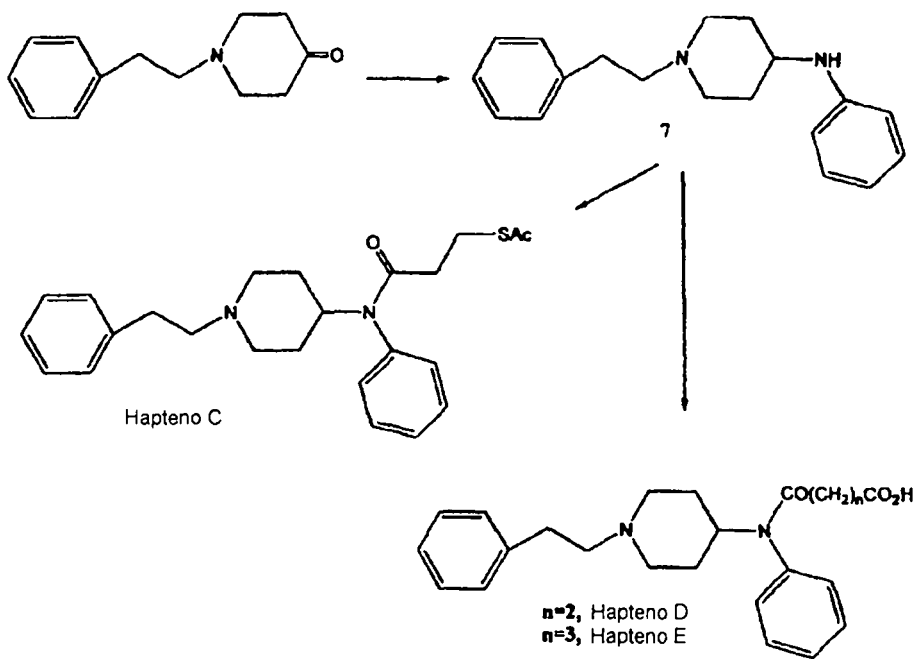


Figura 3

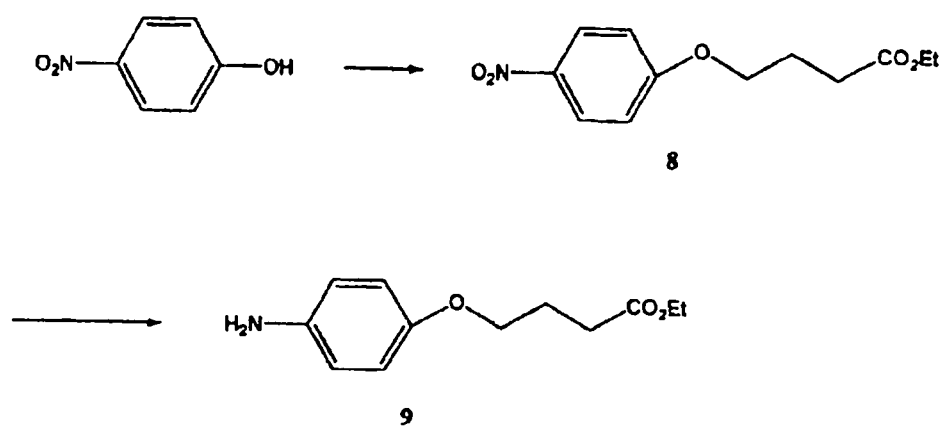


Figura 1a

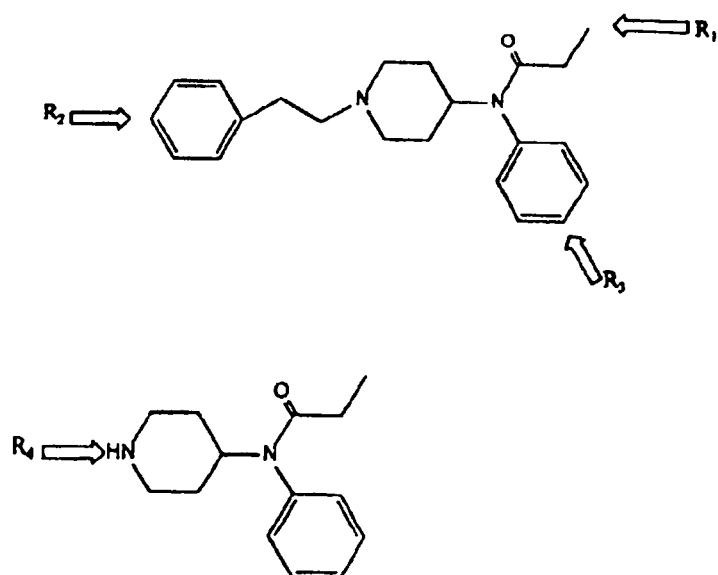


Figura 4

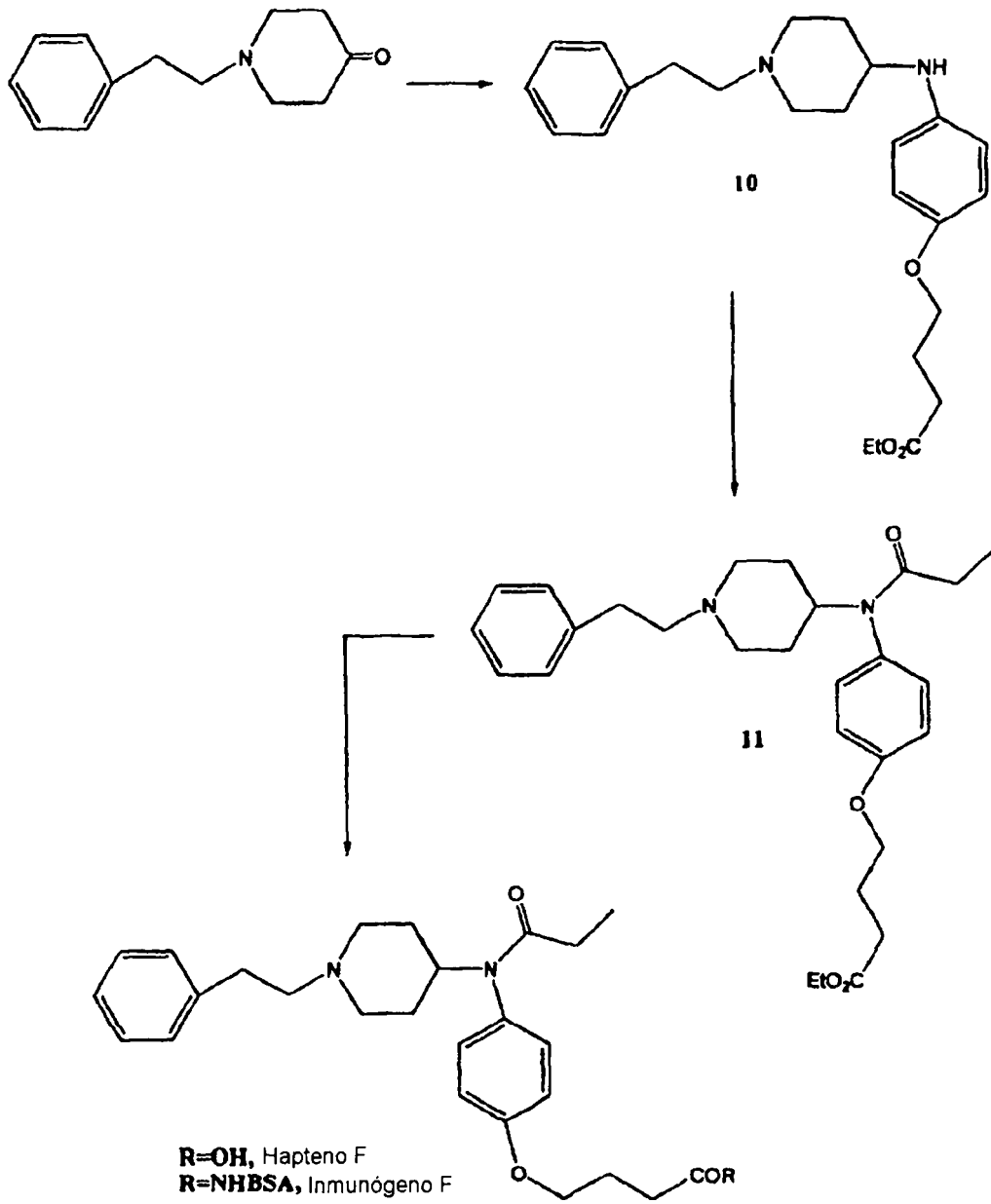
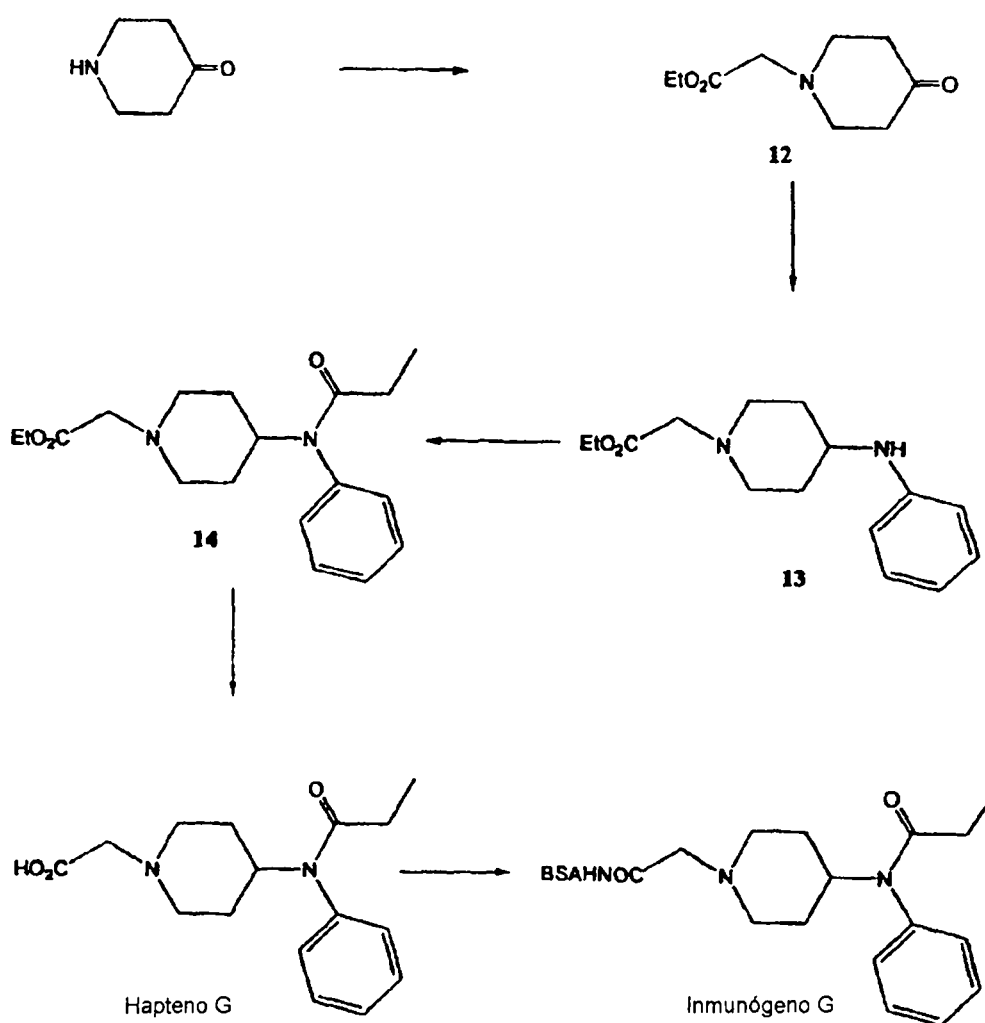


Figura 5



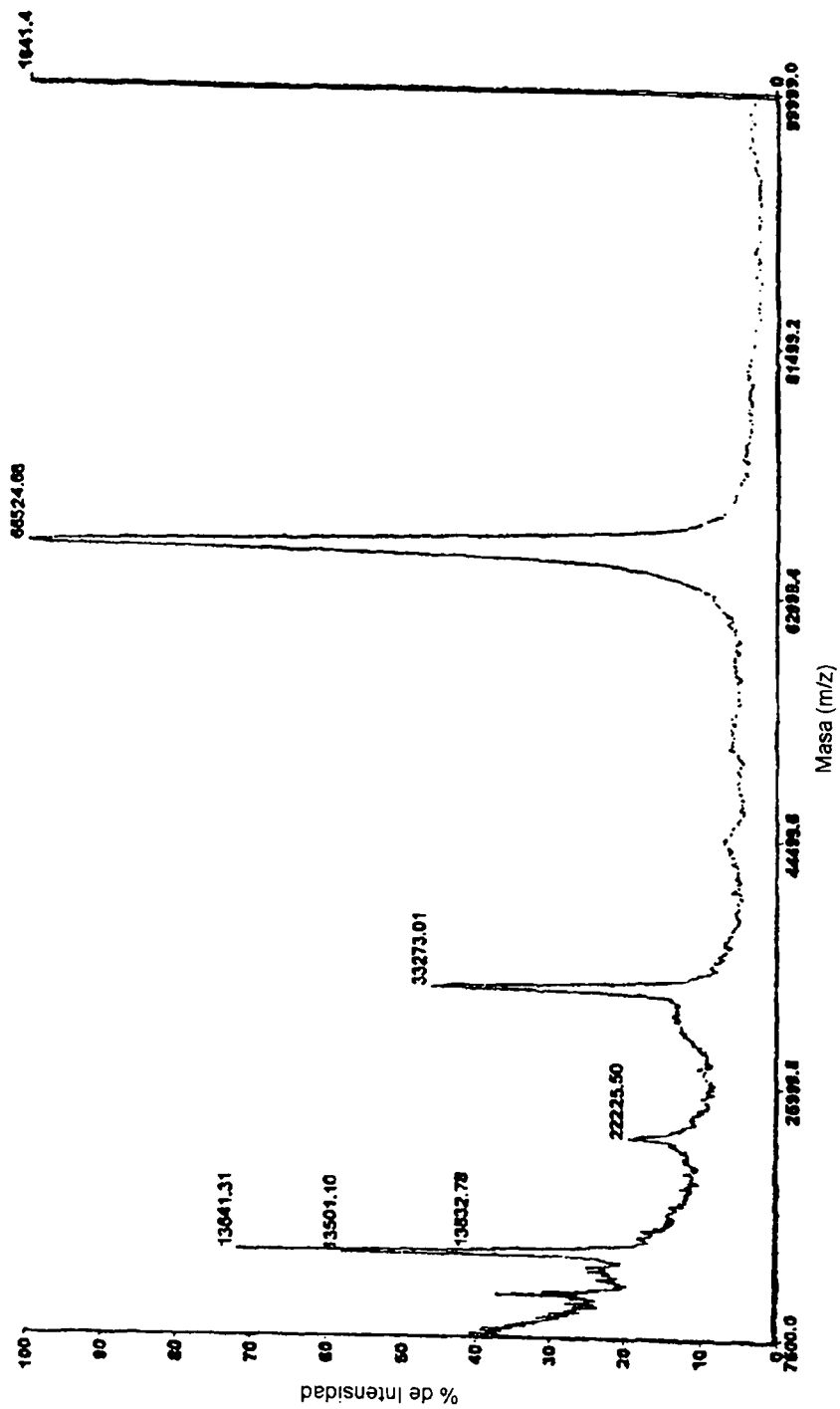


Figura 6: Material Portador de BSA

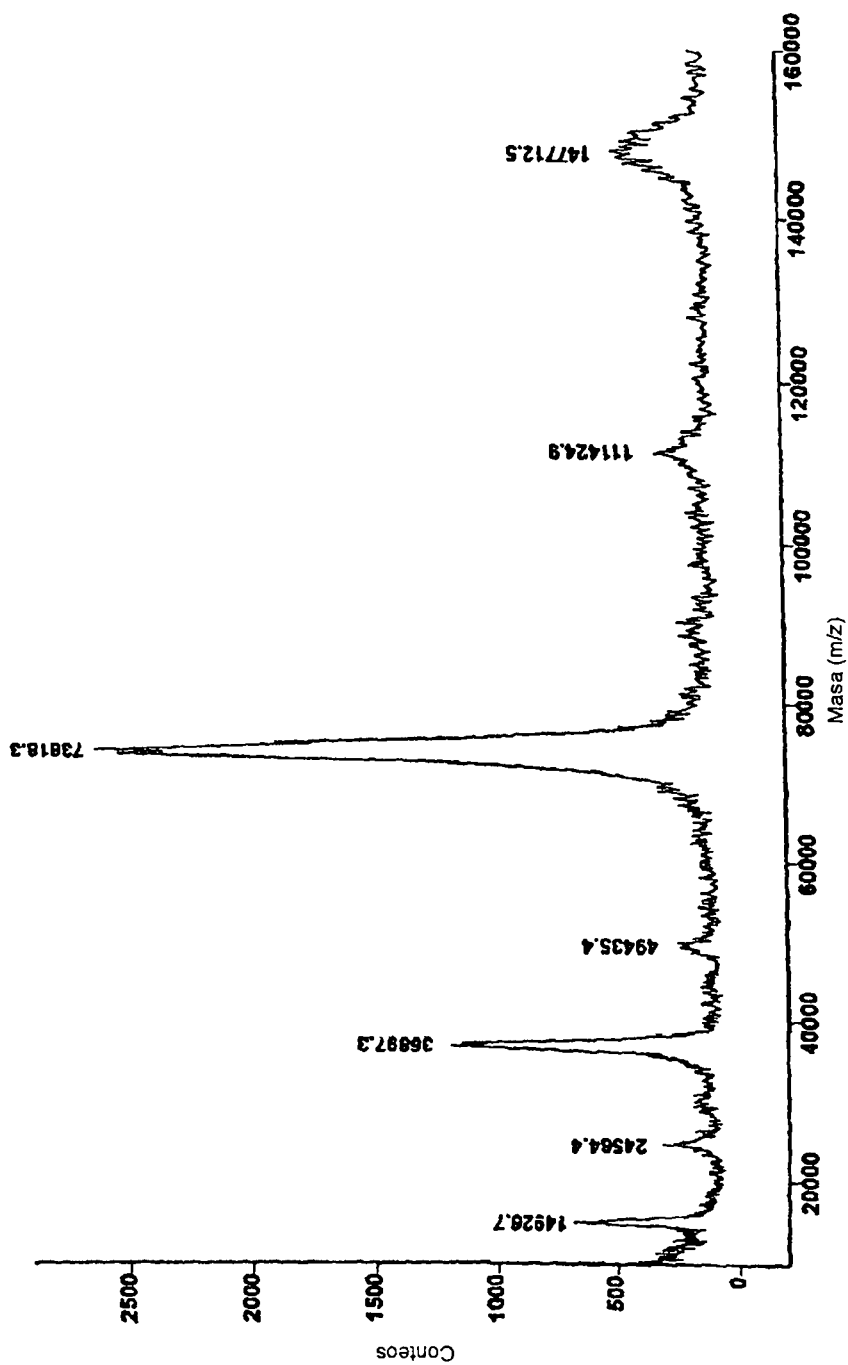


Figura 7: Material Portador de BSA Modificada con Bromoacetilglicina

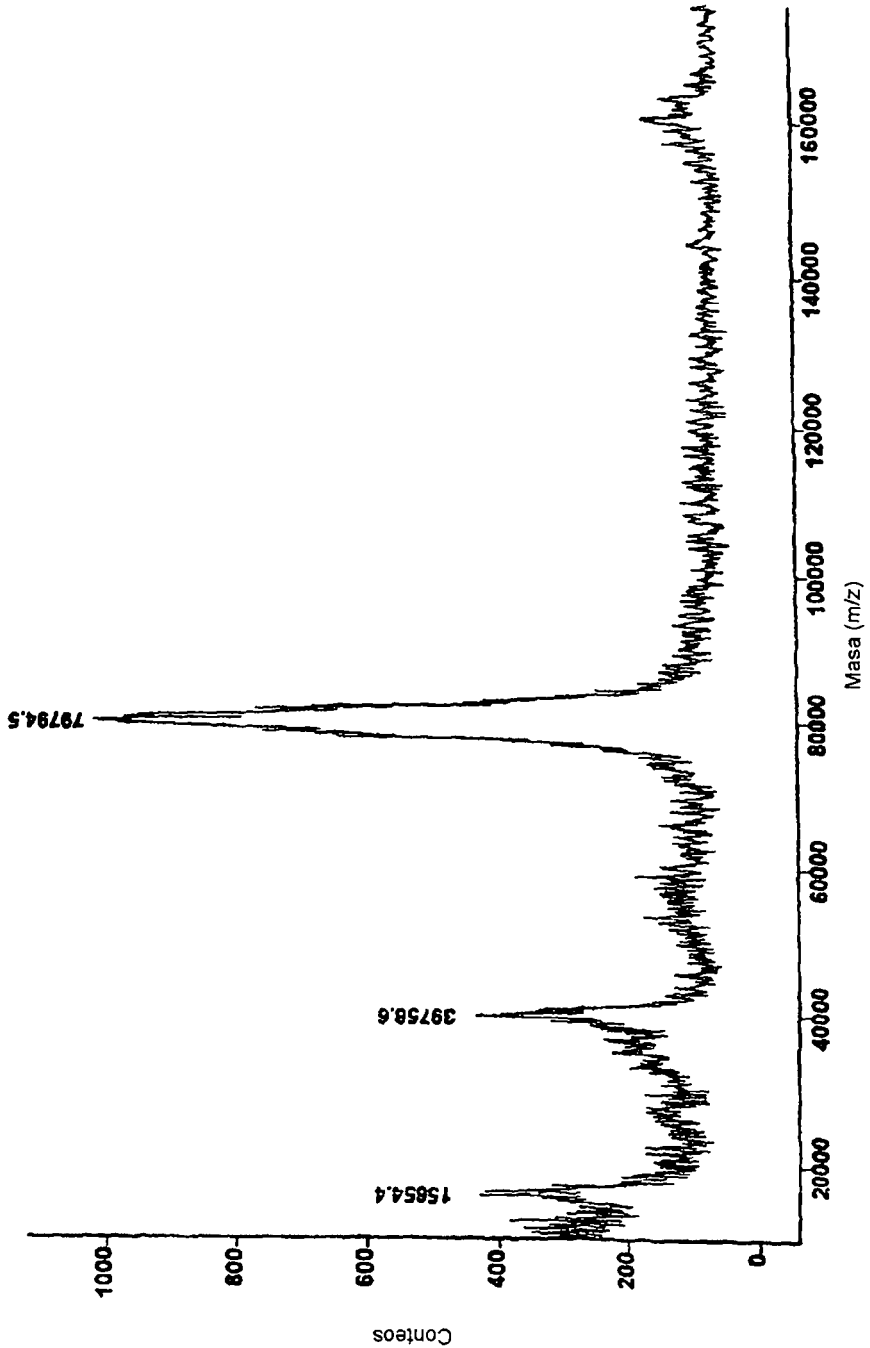


Figura 8: Hapteno A Conjugado a BSA Modificada con Bromoacetilglicina

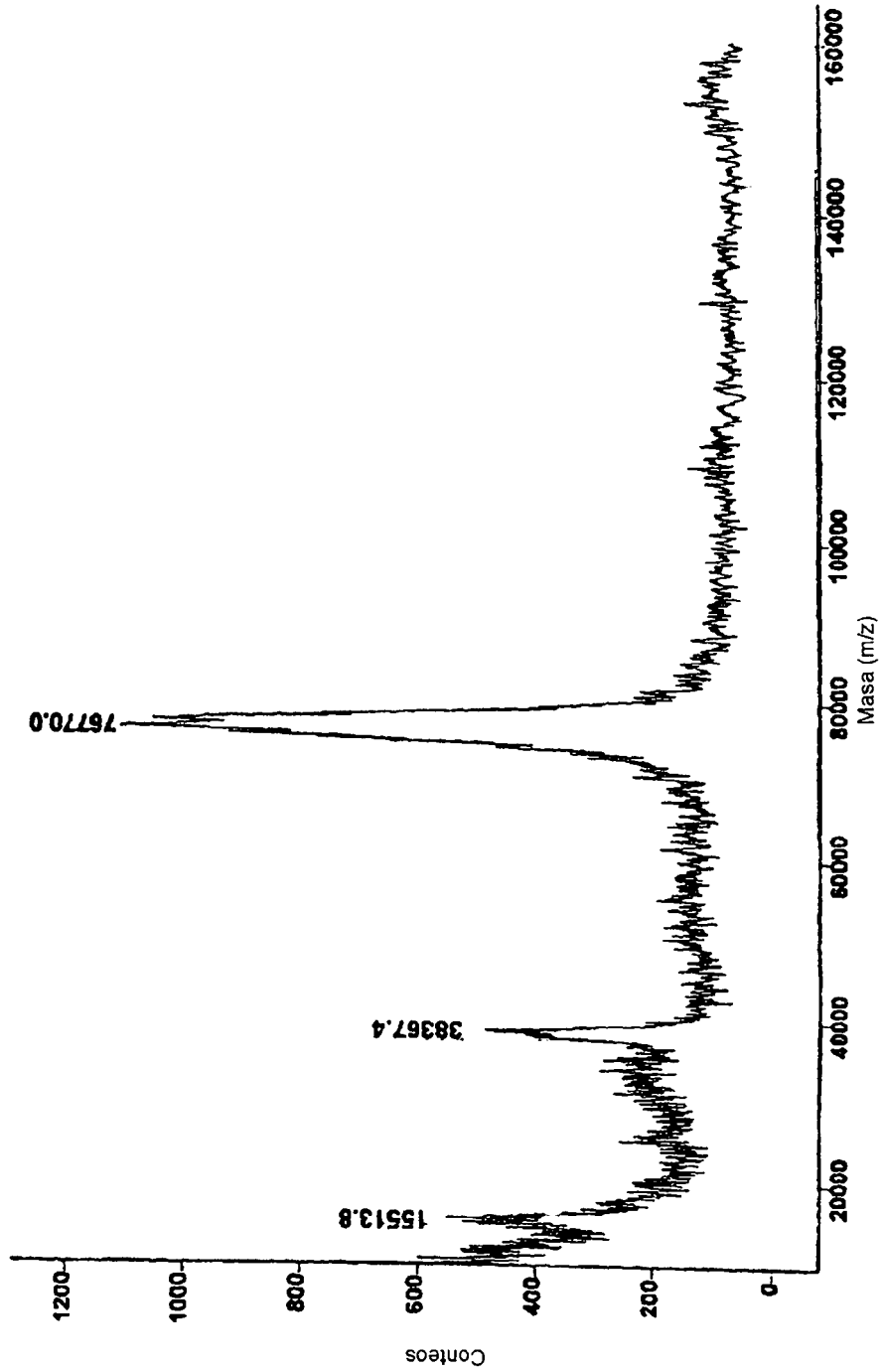


Figura 9: Hapteno C Conjugado a BSA Modificada con Bromoacetilglutamina

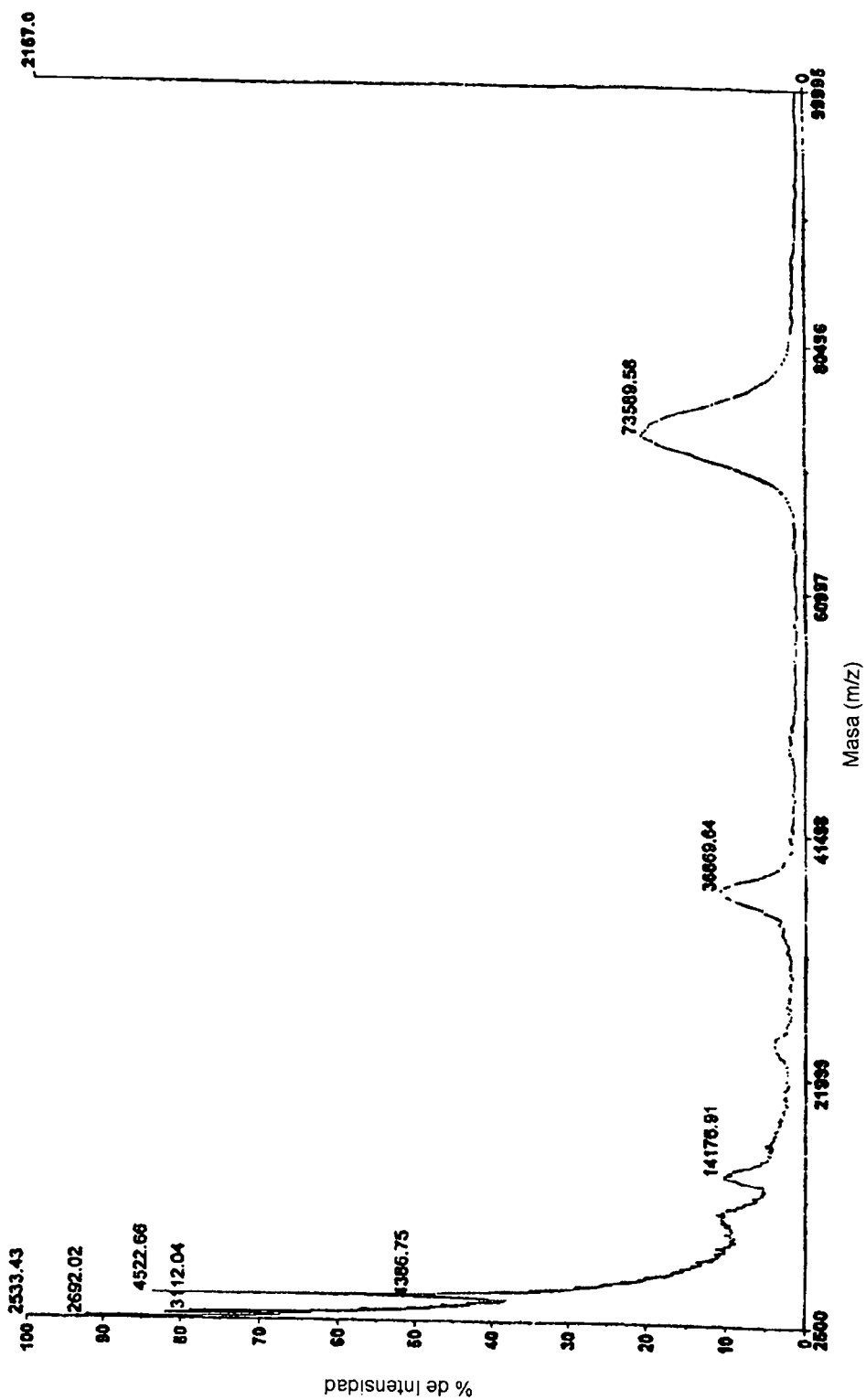


Figura 10: Hapteno F Conjugado a BSA

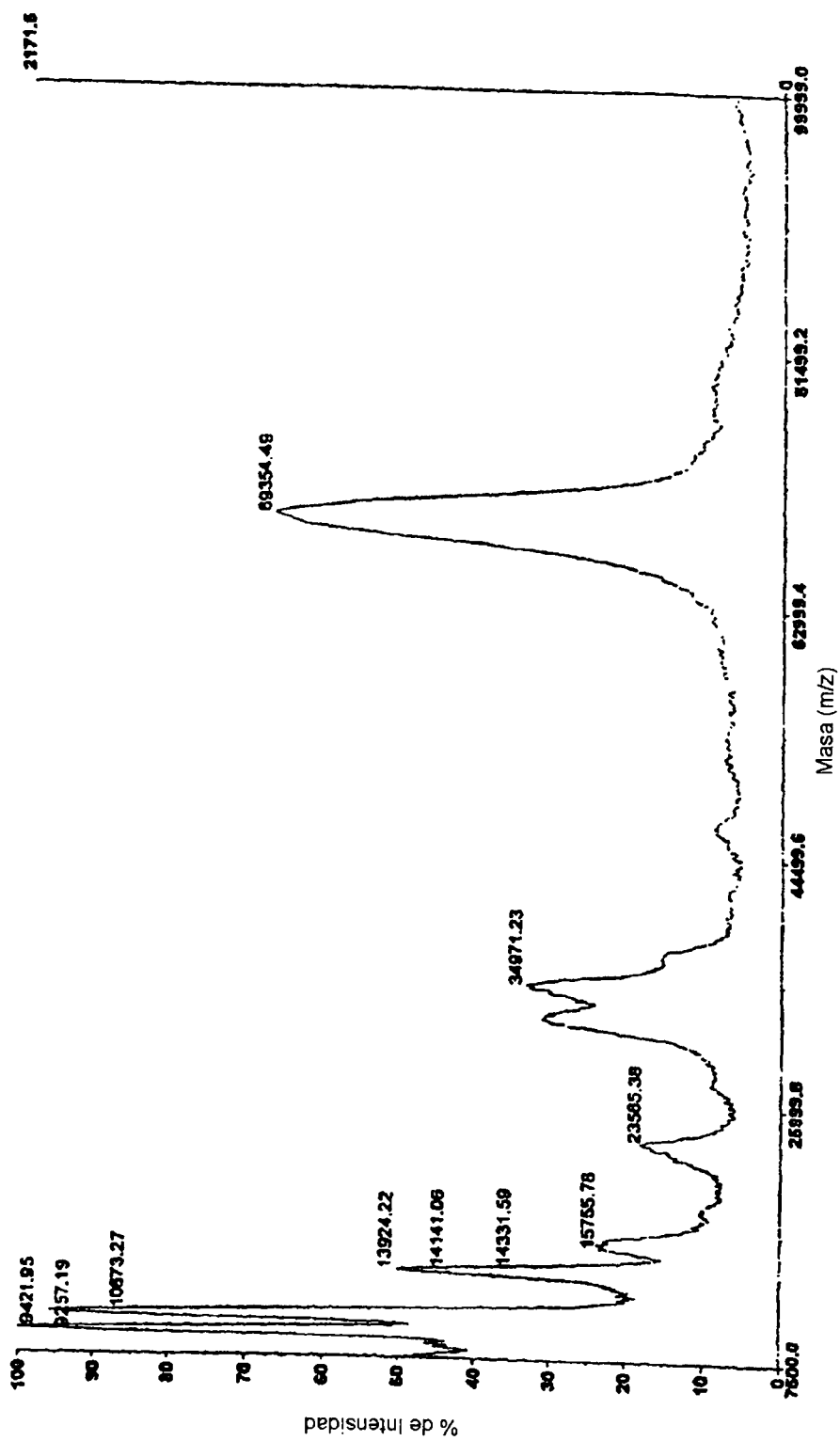


Figura 11: Hapteno G Conjugado a BSA



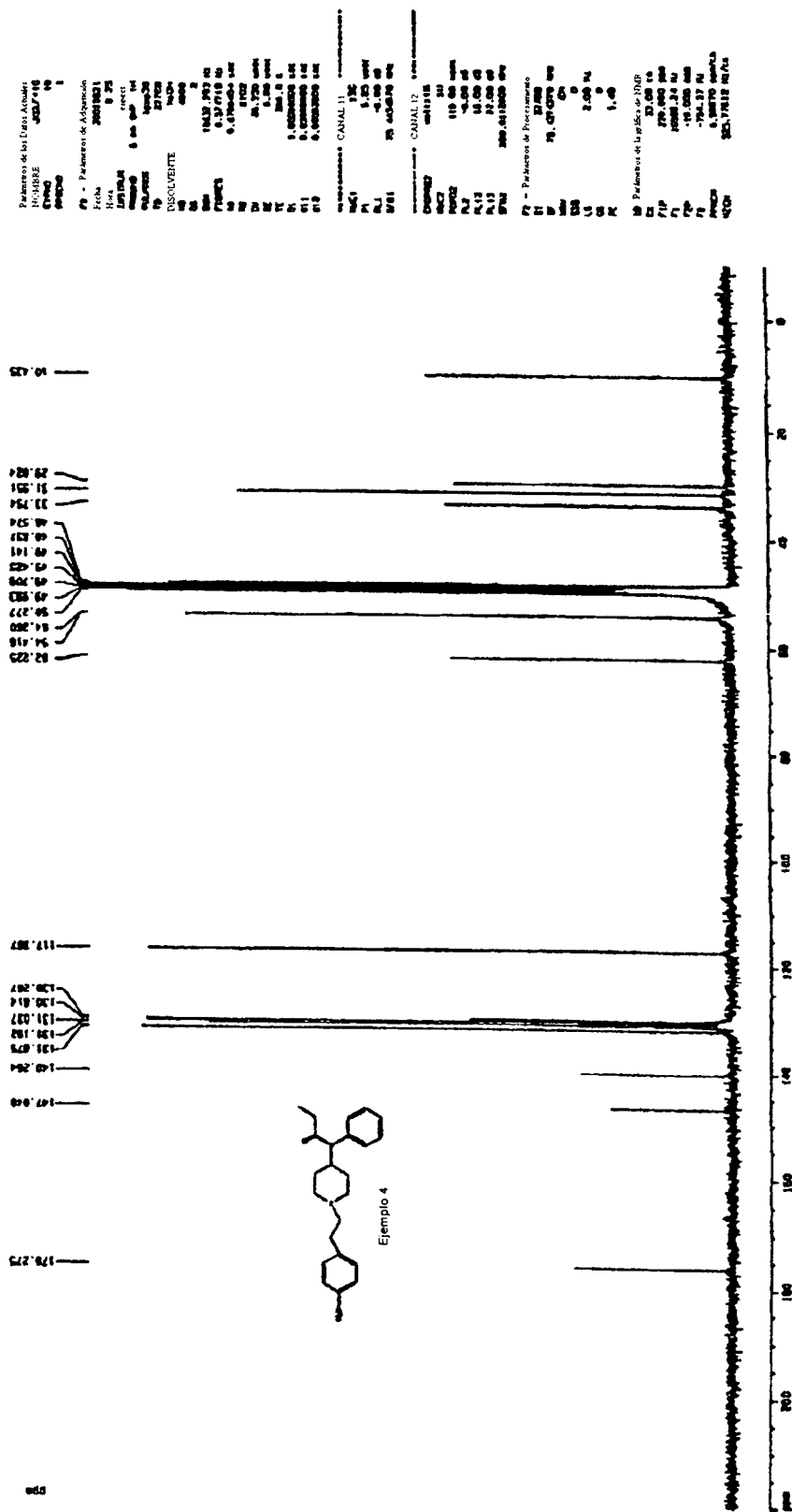


Figura 13





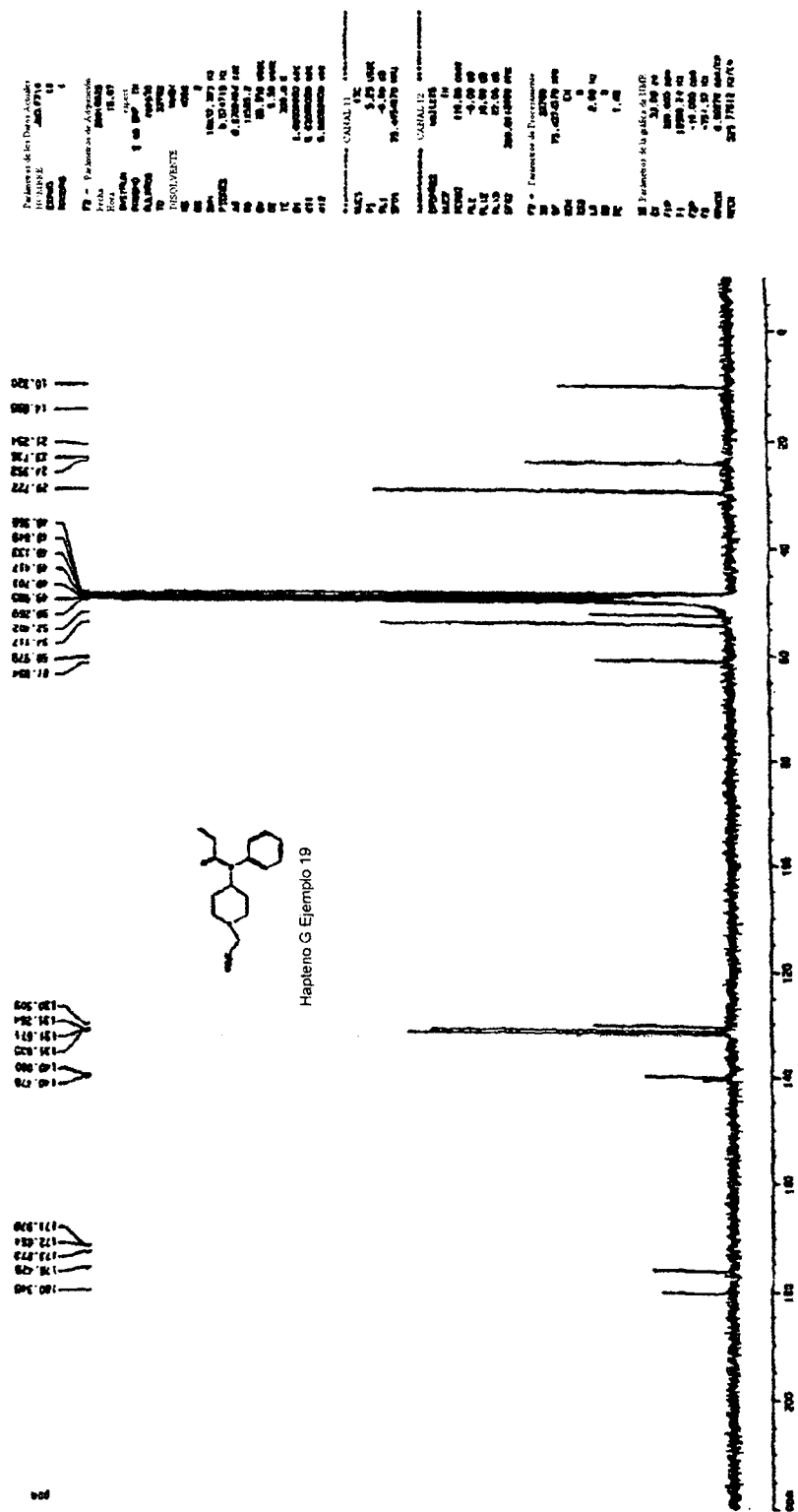


Figura 16