



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 520**

51 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02080462 .1**

96 Fecha de presentación : **17.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1321772**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

54 Título: **Método y conjunto para detectar, o determinar, la 3,4-metilenodioximetanfetamina.**

30 Prioridad: **20.12.2001 EP 01205058**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

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 P. y
Lamont, John Victor

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

ES 2 316 520 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 conjunto para detectar, o determinar, la 3,4-metilenodioximetanfetamina.

La presente invención se relaciona con un método y conjunto para detectar, o determinar, MDMA (3,4- metileno-dioximetanfetamina) y sus análogos metilenodioxi.

Por “detección” se entiende el análisis cualitativo de la presencia o ausencia de una sustancia.

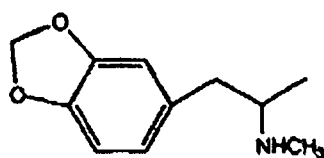
Por “determinación” se entiende el análisis cuantitativo de la cantidad de una sustancia.

Por “análogos metilenodioxi” se entiende los derivados N-(mono- o di-) alquilados (por ejemplo, N-metilado o N-etilado) de la metilenodioxianfetamina (MDA).

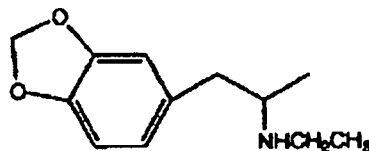
La presente invención describe la conjugación de novedosos derivados de hapteno de MDMA, estando los haptenos unidos covalentemente a un material portador que confiere antigenicidad o a un agente marcador, con el fin de producir inmunógenos o conjugados de la presente invención, respectivamente. La presente invención también describe como los anticuerpos generados para estos inmunógenos se emplean en el desarrollo de un ensayo específico que se puede utilizar para detectar, o determinar, MDMA o sus análogos metilenodioxi en fluidos biológicos.

El método y conjunto de la presente invención tienen la intención de ser altamente específicos para MDMA pero reaccionarán en cruz con los análogos metilenodioxi tales como 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA). El método y conjunto de la presente invención tienen la intención de no reaccionar en cruz significativamente con la anfetamina y metanfetamina relacionadas estructuralmente.

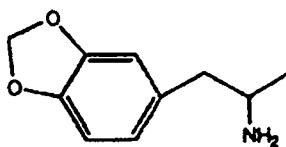
Las estructuras de MDMA, MDEA y MDA se exponen a continuación:



1 MDMA (Éxtasis)



2 MDEA (Eve)



3 MDA

La MDMA y sus análogos metilenodioxi son drogas psicoactivas de las cuales se abusa con más frecuencia. El metabolito principal de MDMA es MDA. Sin embargo, 65% de MDMA se excreta sin cambios en la orina. Los compuestos utilizados más frecuentemente de los diversos productos clandestinos son la 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, 1), también conocida como Éxtasis, la 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA, 2), también conocidos como Eve, y la 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA, 3). Estos compuestos ejercen sus efectos principalmente en el sistema de la serotonina y, en una menor medida, en el sistema de la dopamina. La popularidad de los derivados de la metilenodioxianfetamina, se puede atribuir a sus efectos psicotrópicos.

Aunque MDMA, MDEA y MDA generalmente se consideran como drogas recreacionales relativamente seguras, se ha hecho cada vez más evidente que su uso se puede asociar con muchos efectos adversos y complicaciones, algunas de las cuales pueden conducir a un desenlace fatal. Adicionalmente, se ha encontrado que MDMA y MDA dañan las neuronas de la serotonina en todos los animales de experimentación probados hasta hoy, y existen preocupaciones más serias de que los usuarios de estas drogas, están en riesgo de neurotoxicidad de la serotonina, especialmente después del uso repetido de altas dosis de la droga.

Hasta la fecha, la determinación de MDMA y sus análogos metilenodioxi en fluidos biológicos se han basado principalmente en espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS), y HPLC. Estos métodos cromatográficos proporcionan excelente sensibilidad y selectividad pero requieren una derivatización de la MDMA y sus análogos metilenodioxi. Estos métodos son, además, demasiado costosos y demandan mucho tiempo, para su uso como herramientas de detección.

ES 2 316 520 T3

Las reacciones de enlace específico, tales como interacciones anticuerpo-antígeno, han sido utilizadas extensamente en inmunoensayos para detectar una variedad de sustancias presentes en los fluidos biológicos.

De esta manera, por ejemplo, los radioinmunoensayos se podrían utilizar para la determinación de la cantidad de MDMA y sus análogos metilenodioxio. Los radioinmunoensayos son muy sensibles, pero requieren trazadores de radionúclidos, por ejemplo ^{125}I y ^3H , y en algunos casos, una etapa de extracción preliminar. No existen RIAs conocidos para MDMA y sus análogos metilenodioxio.

Los ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISAs) son una alternativa no-radioactiva, que se conoce para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa de diversos derivados de la anfetamina. Sin embargo, alguien de habilidad apreciará que los derivados de la anfetamina carecen del anillo metilenodioxio de la MDMA. De esta manera, por ejemplo, EP 0 399 184 A2 (Abbott Laboratories) describe los reactivos, métodos y conjuntos para la detección y determinación de derivados de la anfetamina por inmunoensayo por polarización de fluorescencia. EP 0 399 184 A2 prepara haptenos, inmunógenos y anticuerpos de diversas anfetaminas, todos los cuales carecen del anillo metilenodioxio de la MDMA. El ejemplo 20 de EP 0 399 184 A2 confirma que estos reactivos muestran menos del 30% de reacción cruzada, calculada como concentración encontrada sobre la concentración añadida, para MDMA, MDEA y MDA (ver Tabla 2)). Adicionalmente, EP-A-820984 describe la preparación de haptenos, inmunógenos y anticuerpos para la anfetamina y la metanfetamina, los haptenos de los cuales todos carecen del anillo metilenodioxio de la MDMA. Actualmente, los haptenos de EP-A-820984 se derivatizan a través del anillo fenil sin fundir de la anfetamina, mientras que, por el contrario, MDMA y sus análogos metilenodioxio contienen un anillo metoxilenodioxio fundido al anillo fenil.

Los ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISAs) son una alternativa no-radioactiva, los cuales se conocen para la determinación genérica de anfetaminas como una clase. Específicamente, ambos Emit (Registered Trade Mark) II Plus Monoclonal (supplied by Syva Company) y Cedia (Registered Trade Mark) DAU (supplied by Microgenetics/Roche) son EIAs para las anfetaminas. Las reacciones cruzadas respectivas son del 69% para MDMA (Cedia) cuando se compara con 100% para D-metanfetamina y 14.3% para MDMA cuando se compara con 100% para D, L-metanfetamina (Emit).

Los ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISAs) también se conocen para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa de MDMA y sus análogos metilenodioxio.

Los inmunoensayos de MDMA disponibles anteriormente de Cozart Bioscience Limited (45 Milton Park, Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RU, United Kingdom) son simplemente pruebas de detección, que requieren confirmación por qué Cozart indica como preferido un método químico alternativo "más específico" de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS). De esta manera, el Cozart methamphetamine EIA (disponible en Octubre, 2001 - actualmente recogido) mostró significativa reacción cruzada, cuando se compara con 100% para metanfetamina, contra MDMA (758-1250%), MDEA (50-100%) y N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butamina (MBDB) (150-200%), mientras que el Cozart MDMA EIA (disponible en Octubre, 2001 - actualmente recogido) mostró significativa reacción cruzada, cuando se compara con 100% para MDMA, con D-metanfetamina (52-80%) y DL-MBDB (10.4-20%). Estos dos ensayos Cozart actualmente han sido reemplazados por un conjunto de metanfetamina Cozart único, el cual muestra una reacción cruzada del 43-49% para MDMA, cuando se compara con 100% para la metanfetamina.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 316 520 T3

Los datos de la reacción cruzada para los diversos ensayos mencionados anteriormente, se han vuelto a calcular, relativo al 100% para MDMA y estos datos se presentan esquemáticamente en la siguiente tabla:

Compuesto	Anfetamina Cozart	Metanfetamina Cozart y MDMA	Metanfetamina Cozart	MDMA Cozart	CEDI A	Emit
MDMA	100	100	100	100	100	100
D- Anfetamina	1,428	1.52	1	0.2 - 0.43	146.5	917
D,L- Anfetamina	-	-	-	-	84.1	545.6
L- Anfetamina	-	-	-	-	4.35	120.13
D- Metanfetami na	-	217	10	52 - 80	145	-
D,L Methanfe tamina	-	-	-	-	94.25	699.7
L- Metanfetami na	-	-	-	4 - 22	17.4	378.7
MDA	208488- 304164	0.87	0.36	0.3 - 0.74	2.76	430.1
MDEA	228.5	10.85	5 - 10	7.0 - 13.0	-	-
MBDB	-	319 - 334.2	15 - 20	10.4 - 20	-	-

Objetos de la invención

Es un objeto de la invención superar algunos o todos los inconvenientes del oficio previo, o proporcionar una alternativa a estos.

Es un objeto de una modalidad preferida de la invención proporcionar un método y un conjunto para detectar, o determinar la cantidad de, MDMA y sus análogos metilenodioxi.

El objetivo de la presente invención es superar los problemas de falta de especificidad asociados con inmunoensayos conocidos para MDMA, preparando un anticuerpo altamente específico a MDMA y sus análogos metilenodioxi, que no presentan reacción cruzada significativamente con d-anfetamina y (+)-metanfetamina. Por "no significativamente" se entiende (para cada una de d-anfetamina y (+)-metanfetamina) una reacción cruzada de menos de aproximadamente 7.5%, preferiblemente menos de aproximadamente 5%, más preferiblemente menos de aproximadamente 1%, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 0.5%, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.25%, cuando se compara con 100% para MDMA. Con el fin de lograr tal especificidad, los haptenos descritos en la presente invención se generan por una derivatización en la posición-N de MDMA.

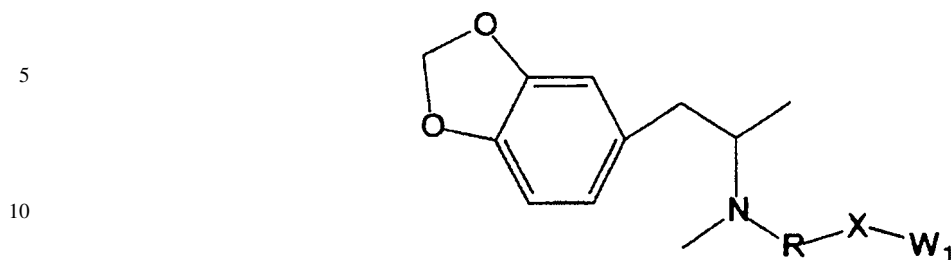
Es otro objeto de una modalidad preferida de la presente invención desarrollar anticuerpos capaces de unirse con, como un epítopo estructural, el intacto anillo metilenodioxi de MDMA y los análogos metilenodioxi.

Descripción detallada de la invención

La invención describe un hapteno en el cual el hidrógeno unido al N de MDMA se reemplaza por (en otras palabras, se derivatiza con) un agente reticulante.

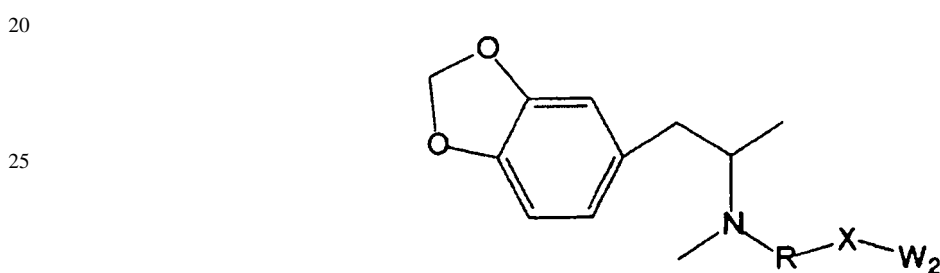
ES 2 316 520 T3

En un primer aspecto, la invención proporciona un inmunógeno de la siguiente fórmula estructural:



en la cual R es un primer grupo bivalente y X es un segundo grupo bivalente (o ligador W_1), y en la cual W_1 es un material portador que confiere antigenicidad. Preferiblemente, el material portador es una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semi-sintético.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado de la siguiente fórmula estructural:



en la cual R es un primer grupo bivalente y X es un segundo grupo bivalente (o ligador W_2), y en la cual W_2 es un detectable agente marcador detectable. Preferiblemente, el agente marcador se selecciona de una enzima, una sustancia luminescente, una sustancia radioactiva, o una mezcla de estos. Más preferiblemente, el agente marcador es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, más preferiblemente peroxidasa de rábano picante (HRP). Alternativa o adicionalmente, la sustancia luminescente puede ser un material bioluminescente, un quimioluminescente o un fluorescente.

En la primera y segunda modalidades, el agente reticulante es -R-X-.

Preferiblemente, R comprende:



en la cual Z es una fracción alquileo sustituida o no sustituida, de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada o un arileno sustituido o no sustituido, preferiblemente una fracción fenileno; Y es una fracción alquileo sustituida o no sustituida, de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada; a es 0 o 1 y b es 0 o 1, con la condición que a y b no puedan ambos ser 0. En otras palabras, uno de Z y Y o, alternativamente, ambos de Z y Y deben estar presentes en R. Más preferiblemente, b es 0, a es 1 y Z es una fracción alquileo C_{1-6} , sustituida o no sustituida, de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada.

Más preferiblemente, Z es una fracción alquileo C_{3-4} no sustituida, de cadena lineal, saturada.

Ventajosamente, X, antes de la reacción con W_1 o W_2 , se selecciona de un ácido carboxílico o un éster de este, una amina, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster de este, un ácido tiocarboxílico o un éster de este, un aldehído, un piridilditio o una fracción vinilsulfona.

Más ventajosamente, X, antes de la reacción con W_1 o W_2 , se selecciona de un ácido carboxílico (-COOH), una amina (-NH₂) y un tiocarboxilato éster (-S-CO-CH₃).

En otro aspecto, la presente invención considera los anticuerpos cultivados contra el inmunógeno del primer aspecto de la presente invención, siendo los anticuerpos capaces de unirse con al menos un epítopo estructural de MDMA, preferiblemente con el epítopo estructural del anillo metilenodioxo intacto. Los anticuerpos tienen especificidad por MDMA y otros análogos metilenodioxo. Los anticuerpos deberían tener una reacción cruzada de menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, más preferiblemente menos del 1%, más preferiblemente menos del 0.5% para la anfetamina y la metanfetamina relacionadas estructuralmente. Preferiblemente, los anticuerpos se fijan en un sustrato de refuerzo. Preferiblemente, los anticuerpos son policlonales. Como alternativa, los anticuerpos son monoclonales.

La invención además proporciona un proceso de preparación de los anticuerpos, el proceso que comprende, las etapas de inmunización de un animal, preferiblemente un animal vertebrado, más preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y la recolección del suero resultante a partir del animal inmunizado. Preferiblemente, el proceso además comprende la fijación de dichos anticuerpos del suero a un sustrato de refuerzo, preferiblemente a un soporte sólido, más preferiblemente un soporte sólido de poliestireno. Los anticuerpos preparados de acuerdo con este proceso son policlonales.

En aún otro aspecto, la presente invención comprende un método para detectar o determinar la MDMA y sus análogos metilenodioxi en una muestra, método que comprende el contacto de la muestra con el conjugado de la presente invención, o una mezcla de este, y con los anticuerpos de la presente invención, o una mezcla de estos; la detección, o determinación de la cantidad del, conjugado unido; y la deducción a partir de una curva de calibración de la presencia de, o la cantidad de, MDMA y sus análogos metilenodioxi en la muestra.

En otro aspecto, la invención incluye un conjunto para detectar o determinar la MDMA y sus análogos metilenodioxi, el conjunto incluye el conjugado de la presente invención, o una mezcla de estos y los anticuerpos de la presente invención, o una mezcla de estos. El conjunto opcionalmente puede incluir instrucciones para el uso de dichos conjugados y dichos anticuerpos para detectar o determinar la MDMA y sus análogos metilenodioxi en una muestra.

Preferiblemente, la muestra es una solución, tal como un fluido biológico. Más preferiblemente, la muestra es suero u orina. Más preferiblemente, la muestra es una solución a partir de un paciente humano.

En el método y conjunto de la presente invención, se prefiere que los ligadores en cruz respectivos (del inmunógeno y el conjugado) sean diferentes.

En otro aspecto, la presente invención involucra el uso de los conjugados de acuerdo con la presente invención, o una mezcla de estos, con los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, o una mezcla de estos, para detectar o determinar la MDMA y sus análogos metilenodioxi en muestras de prueba tales como fluidos biológicos.

Preparación de Haptenos

Los derivados de hapteno N-(3'-carboxipropil) MDMA (compuesto 7), N-(4'-aminobutil) MDMA (compuesto 9) y N-(3-acetilpropil) MDMA (compuesto 10) se preparan como se esquematiza en la Figura-1. Primero es la preparación de la 3,4-metilenodioximetanfetamina (compuesto 1) a partir del ácido 3,4-(metilenodioxi) fenilacético (compuesto 4) en dos etapas: reacción del compuesto 4 con anhídrido acético/piridina y la posterior hidrólisis del intermedio con HCl concentrado en etanol con reflujo, proporciona el 3,4-(metilenodioxi) fenilacetona (compuesto 5). La reacción del compuesto 5 con metilamina clorhidrato en metanol en la presencia de trietilamina y cianoborohidruro de sodio, proporciona la MDMA (compuesto 1) con una buena producción. Los haptenos 7, 9 y 10 se obtienen a partir del compuesto 1 como sigue:

Hapteno 7

La reacción del compuesto 1 con etil-4-bromobutirato en acetonitrilo con reflujo en la presencia de yoduro de potasio catalítico, da el éster-compuesto 6. El hapteno 7, N-(3'-carboxipropil) MDMA, se obtiene después de la saponificación del compuesto 6, mediante hidróxido de potasio en tetrahidrofurano (THF)/agua.

Hapteno 9

La reacción del compuesto 1 con (N-(4-bromobutil)ftalimida en etanol con reflujo, seguido por la hidrólisis del grupo ftalimida mediante hidrato de hidrazina en metanol con reflujo, proporciona el hapteno N-(4'-aminobutil) MDMA (compuesto 9).

Hapteno 10

El hapteno 10 [N-(3 -acetilpropil) MDMA] se prepara por reacción de MDMA (compuesto 1) con yodopropil-tioacetato en etanol con reflujo.

Preparación de Inmunógenos y Conjugados

Aunque los haptenos de MDMA proporcionan epítopes estructurales definidos (el anillo metilenodioxi intacto), no son por ellos mismos inmunogénicos y por consiguiente es necesario que se conjuguen con el material portador, para producir una respuesta inmunogénica cuando se inyecta en un animal huésped. Los apropiados materiales portadores incluyen proteínas tales como albúminas, proteínas del suero por ejemplo, globulinas, proteínas de lentes oculares y lipoproteínas. Los portadores de proteínas ilustrativos incluyen albúmina de suero de bovino, ovoalbúmina, globulina gamma de bovino, globulina de enlace de tiroxina, hemocianina de lapa californiana (KLH) etc. Como alternativa, se pueden emplear los poli (aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amina disponibles tales como lisina, como muchos otros materiales poliméricos sintéticos o naturales que llevan grupos funcionales reactivos. En particular, carbohidratos, levaduras o polisacáridos se pueden conjugar con el hapteno para producir un inmunógeno.

Cada hapteno también puede estar unido covalentemente a un agente marcador tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o un nivel radioactivo para producir conjugados (o reactivos de detección) para utilizar en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado de esta.

Con el fin de confirmar que la conjugación adecuada del hapteno con el material portador ha sido lograda, antes de la inmunización, cada inmunógeno se evalúa utilizando espectrometría de masas con desorción láser UV de matriz asistida/ionización tiempo de escape (MALDI-TOF MS). En el caso del material portador preferido, albúmina de suero de bovino, se prefiere, un mínimo de 6 moléculas de hapteno por molécula portadora.

En la preparación de conjugados o inmunógenos con haptenos donde un grupo tiol esta presente tal como, por ejemplo, grupos hapteno 10, maleimida, halo, piridilditio o vinilsulfona se debe primero introducir con el agente marcador o material portador, respectivamente, utilizando ligadores heterobifuncionales tales como, pero no se limitan a: éster N-(γ -maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBS); succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC); (m-maleimidobenzoi)-N-hidroxisuccinimida (MBS); succinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato (SMPB); N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB); bromoacetilglicina N-hidroxisuccinimida; N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP); vinilsulfona (Pierce Chemical Company, USA). El agente marcador o material portador, modificado de esta manera, luego se puede conjugar vía el grupo tiol presente en el hapteno, tal como hapteno 10. Para los haptenos sin un grupo tiol presente, tales como los haptenos 7 y 9, la conjugación se realiza sin la modificación anterior del agente marcador o material portador, según sea apropiado, utilizando métodos de conjugación estándar tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) o un anhídrido mezclado. Específicamente, el hapteno 7 se conjuga con, por ejemplo, HRP por EDC y el hapteno 9 por metaperiodato de sodio, seguido por la reducción de la base de Schiff con cianoborohidruro de sodio.

Preparación de Antisuero de doble fase

Con el fin de generar antisuero policlonal, el inmunógeno se mezcla con Adyuvante de Freund y la mezcla se inyecta en un animal huésped, tal como un conejo, ovejas, ratón, conejillo de Indias o caballo. Inyecciones adicionales (refuerzos) se hicieron y el suero se muestreo para la evaluación del título del anticuerpo. Cuando el título óptimo se ha alcanzado, el animal huésped, entonces se desangra, para producir un volumen apropiado de antisuero específico. El grado de purificación del anticuerpo requerido depende de la intención de la aplicación. Para muchos propósitos, no hay ningún requisito en absoluto para la purificación, sin embargo, en otros casos, tales como donde el anticuerpo se ha inmovilizado sobre un soporte sólido, las etapas de purificación se pueden tomar para extraer el material indeseado y eliminar el enlace no específico.

Los anticuerpos específicos de la presente invención son útiles como reactivos en inmunoensayos para la detección, o para la determinación, de MDMA y los análogos metilenodioxo en fluidos biológicos.

Procedimiento General para Análisis de Inmunógenos de MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas de desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción de retardo. Una alícuota de cada muestra que se analiza, se diluyó en 0.1% de ácido trifluoroacético acuoso (TFA) para crear soluciones de 1 mg/ml de muestra. Las alícuotas (1 μ l) se analizaron utilizando una matriz de ácido Sinapínico y se utilizó albúmina de suero de bovino (Fluka) como un calibrante externo. La Figura 3 de los dibujos acompañantes muestra el análisis para el material portador BSA. Como se puede apreciar, una señal principal se presentó, lo cual indica una masa protonada media para esta muestra de m/z 66,115. La señales observadas a m/z 33,038 y 132,558 son consistentes con el principal componente observado en una forma de doble carga y forma de dímero, respectivamente. Otras señales se observaron incluyendo aquel en m/z 13,505.

En los siguientes Ejemplos, los porcentajes se deben tomar como porcentajes (volumen/volumen), a menos que se especifique de otra manera.

Ejemplos

Ejemplo - 1

Preparación de (3,4-metilenodioxo) fenilacetona 5

El ácido (3,4-Metilenodioxo) fenilacético (compuesto 4) (15 g, 0.0832 mol) se disolvió en anhídrido acético (73.5 ml) y piridina (33.75 ml) y la mezcla se sometió a reflujo por 16 horas. Después del enfriamiento, los solventes se retiraron con vacío (la temperatura se debería mantener tan baja como sea posible) y el residuo se trató con etanol seco (58.5 ml), se adicionó HCl concentrado (5.63 ml) y la mezcla se sometió a reflujo por 2 horas.

Se adicionó agua (150 ml) y se extrajo con diclorometano (3 x 150 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y el solvente se eliminó. El residuo se purificó por cromatografía de columna (Silica gel, 10%-20% acetato de etilo en hexano) para dar 11.25 g (77% de producción) de (3,4-metilenodioxo) fenilacetona (compuesto 5) como un aceite de color naranja.

FT-IR (película, nítida): 1711.67 cm^{-1} (Figura 5).

ES 2 316 520 T3

Ejemplo - 2

Preparación de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) 1

5 El compuesto 5 (4 g, 0.022 mol) se disolvió en metanol (100 ml) y a esta solución en agitación se le adicionó, metilamina clorhidrato (15.16 g, 0.22 mol) y trietilamina (6.76 ml, 0.049 mol). Se le adicionó cianoborohidruro de sodio (1.41 g, 0.022 mol) en metanol (10 ml) en una porción y la mezcla de reacción, se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

10 Los solventes se retiraron con vacío, agua (50 ml) seguido por la adición de HCl 1 N (50 ml) y la mezcla se lavó con dietil éter (100 ml). La fase acuosa se basificó a pH 12-13 con NaOH 2N y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y el solvente se eliminó para proporcionar, la base libre de MDMA cruda (compuesto 1) como un aceite de color marrón con una buena producción.

15 El producto crudo obtenido se utilizó sin una purificación adicional.

FT-IR (película, nítida): 3172, 2779.3, 2715.4, 1246.7 y 1037.9 cm^{-1} (Figura 6).

Ejemplo - 3

Preparación de [etil N-(3-carboxipropil)1-3,4-metilenodioximetanfetamina 6

20 El compuesto 1 crudo (2.4 g) se trató con acetonitrilo seco. Se adicionó etil 4-bromobutirato (2.426 g, 0.12 mol) seguido por el yoduro de potasio (200 mg) y la mezcla resultante se sometió a reflujo por 4-5 horas. Después del enfriamiento, la solución se filtró y el solvente se eliminó con vacío.

La purificación del producto crudo obtenido por cromatografía sobre silica gel (5% de metanol en cloroformo) suministró 1.356 g de un aceite de color naranja pálido de éster 6.

30 FT-IR (película, nítida): 2645.15, 1728.45, 1490.6, 1253.0 y 1036.7 cm^{-1} (Figura 7).

Ejemplo - 4

Preparación de N-(3'-Carboxipropil)-3,4-metilenodioximetanfetamina - Hapteno 7

35 El éster 6 (1.356 g) se trató con tetrahidrofurano (10 ml) y agua (10 ml), se adicionó hidróxido de potasio (0.371 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la TLC (5% metanol (MeOH)/cloroformo) indicó que la reacción se completó.

40 La mezcla se neutralizó, por la adición de HCl 1 N y se redujo a sequedad con vacío. El residuo se trató con etanol (20 ml) y el material inorgánico insoluble se filtró completamente. El solvente se eliminó con vacío y el residuo se recrystalizó a partir de acetonitrilo para dar 0.529 g de hapteno 7 como una espuma de color blanco.

FT-IR(KBr): 3405.63, 1574.53 (br), 1253.22 y 1039.2 cm^{-1} (Figura 8).

45 Punto de fusión (acetonitrilo): 37-40°C.

Ejemplo - 5

Preparación de N-(4-butilftalimido)-3,4-metilenodioximetanfetamina 8

50 MDMA 1 cruda (2.35 g) se trató con etanol absoluto (20 ml), se adicionó N-(4-bromobutil)ftalimida (3.14 g, 0.0128 mol) y la mezcla resultante se sometió a reflujo por 4-5 horas. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, el solvente se eliminó con vacío y el residuo se sometió a cromatografía sobre silica gel, utilizando 10% de metanol en cloroformo, para dar 2.013 g del compuesto 8 como un aceite de color marrón claro.

FT-IR (película, nítida): 2633.0, 1709.2, 1398, 1252 y 1039.1 cm^{-1} (Figura 9).

Ejemplo - 6

Preparación de N-(4'-Aminobutil)-3,4-metilenodioximetanfetamina Dihidrocloridrato-Hapteno 9

60 El Compuesto 8 a partir del Ejemplo-5 (2.013 g, 0.005 mol) se trató con metanol seco (50 ml) y se le adicionó hidrato de hidrazina (0.246 g). La mezcla se sometió a reflujo por 2 horas, después de esto, se adicionaron otros 0.138 g de hidrato de hidrazina y se continuó el reflujo por otras 2 horas. La mezcla luego se enfrió a temperatura ambiente y los solventes se eliminaron con vacío para suministrar un aceite de color marrón.

ES 2 316 520 T3

El aceite se trató con la mínima cantidad de agua y se trató con aproximadamente 10 ml de HCl 1 N (pH 4-5). El precipitado se filtró completamente y el filtrado se basificó a pH 12-13 con NaOH 6 N y se extrajo con diclorometano (4 x 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y el solvente se eliminó para suministrar, la base libre como aceite de color marrón pálido.

El aceite se trató con HCl 2 N gaseoso en dietil éter (20 ml) y se agitó por 1-2 horas. El precipitado se recolectó, se lavó con dietil éter frío y se secó para dar 0.877 g de N-(4'-aminobutil)MDMA clorhidrato (hapteno 9) como un sólido de color blanco-crema.

FT-IR (KBr): 3377.66, 2792.44, 1489.3 y 1038.97 cm^{-1} (Figura 10).

Punto de fusión: 232-234°C.

Ejemplo - 7

Preparación de N-(3'-Acetiltiopropil)-3,4-metilenodioximetanfetamina-Hapteno 10

MDMA 1 cruda (2.98 g, 0.0154 mol) se trató con etanol absoluto (50 ml), se adicionó yodopropiltioacetato (5.65 g, 0.023 mols) y la mezcla resultante se sometió a reflujo por 16 horas. La mezcla luego se enfrió a temperatura ambiente y el etanol se eliminó con vacío. La mezcla oscura cruda obtenida se purificó por cromatografía (silica gel; 10% metanol en cloroformo) para dar 2.2 g de N-(acetiltiopropil) MDMA (hapteno 10), como un aceite de color amarillo claro.

FT-IR (película, nítida): 2931.1, 2675.7, 1689.2, 1252.8, 1038.7 y 735.8 cm^{-1} (Figura 11).

Ejemplo - 8

Conjugación de Hapteno 7 con BSA: Inmunógeno 7

A una solución de hapteno 7 (100 mg, 0.36 mmol) en 1 ml de DMF anhidra se le adicionó N-hidroxisuccinamida (49.7 mg, 0.43 mmol) y N,N-diciclohexilcarbodimida (88.9 mg, 0.43 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado blanco de urea formada se filtró completamente y el filtrado se adicionó gota a gota a una solución de BSA (200 mg) en 10 ml de solución reguladora de fosfato 0.05 M, pH 8.5. La mezcla luego se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La solución se dializó contra agua destilada por 20 horas (3 cambios) y se liofilizó.

Por MALDI-TOF (ver Figura 4 de los dibujos acompañantes), una señal principal se presentó en el inmunógeno 7 lo que indica una masa protonada media en m/z 68,118. Las señales observadas a 34,006 y 136,475 son consistentes con el componente principal observado en las formas de dímeros y cargada doblemente, respectivamente. Estos datos sugieren que una media de 7.2 moléculas de hapteno se han conjugado por molécula de BSA.

Ejemplo - 9

Conjugación de Hapteno 7 con HRP

10 mg de EDC clorhidrato se disolvió en 800 μl de agua e inmediatamente se adicionó a una solución de 2 mg de hapteno 7 en 200 μl de DMF. Después de mezclar, esta solución se adicionó a HRP (20 mg) en 1 ml de agua. Inmediatamente se adicionó N-hidroxisulfo-succinimida (5 mg) y la mezcla de reacción se incubó, con agitación, durante la noche a temperatura ambiente. El exceso derivado se eliminó por desalación con columnas de 2 PD-10 (Pharmacia Biotech) en serie, pre-equilibrada con solución reguladora de fosfato salina, pH 7.2 (PBS). El hapteno-HRP conjugado entonces se dializó durante la noche contra 10L de PBS a 4°C.

Ejemplo - 10

Conjugación de Hapteno 9 con HRP

1 ml de una solución de 21 mg/ml de peryodato de sodio se adicionó lentamente con HRP (20 mg) en 1 ml de agua. La solución resultante se agitó por 20 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad, y se dializó contra solución reguladora de acetato 1 mM, pH 4.5, durante la noche a 4°C, en la oscuridad. El Hapteno 9 (2 mg) se disolvió en 200 μl de DMF se adicionó lentamente a la enzima activada y la mezcla de reacción se incubó, con agitación, por 2 horas a temperatura ambiente, en la oscuridad. El exceso derivado se eliminó por desalación con columnas de 2 PD-10 (Pharmacia Biotech) en serie, pre-equilibradas con solución reguladora de fosfato salina, pH 7.2 (PBS). El hapteno-HRP conjugado entonces se dializó durante la noche contra 10L de PBS a 4°C, en la oscuridad.

ES 2 316 520 T3

Ejemplo - 11

Preparación de HRP-bromoacetilglicina

A una solución de HRP (1 g) en solución reguladora de borato 0.1 M (pH 8.5, 45 ml), protegida de la luz y fría a 0°C, se le adicionó gota a gota N-succinimidil bromoacetilglicina (0.375 mg, 0.13 mmol) en DMF (5 ml). Durante la adición, el pH se mantuvo a 8. Después de completar la adición, el pH de la solución se estabilizó a 8 y la solución se agitó en la oscuridad a 0°C por 1 hora. La solución se neutralizó a pH 7 y se dializó durante la noche a 4°C contra agua destilada una vez y PBS, pH 7.2, otra vez.

Ejemplo - 12

Conjugación de Hapteno 10 con bromoacetilglicina HRP modificada

10 mg de Hapteno 10 se disolvieron en 0.5 ml de una solución de carbonato de potasio 0.12 M (80% metanol/20% agua). La solución resultante se dejó por 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. 1 ml de solución reguladora de fosfato 50 mM, pH 7, se adicionó a la solución para detener la reacción y el pH se ajustó a 7.0 - 7.5, mediante la adición de HCl 0.1 M. 300 µl de esta solución se adicionó gota a gota a una solución de bromoacetilglicina HRP modificada (20 mg en 1 ml de agua) y la mezcla se agitó en la oscuridad durante la noche a 4°C. El hapteno-HRP conjugado obtenido se purificó utilizando dos columnas PD10 (Pharmacia Biotech), se eluyó con PBS, pH 7.2, y se dializó durante la noche contra agua a 4°C.

Ejemplo - 13

Preparación de anticuerpos cultivados contra el Inmunógeno de Ejemplo 8 - Inmunógeno 7

Una solución acuosa del inmunógeno preparado en el Ejemplo 8 se formuló con Adyuvante Completo de Freund (FCA) para formar una emulsión que consiste de 2 mg/ml de inmunógeno en 50% (v/v) FCA. Dos ovejas se inmunizaron con esta emulsión, 0.25 ml se le inyectan vía subcutánea a cada uno de 4 sitios en el flanco de cada animal. Las posteriores inmunizaciones (refuerzos) contenían 1 mg/ml de inmunógeno emulsificado en 50% (v/v) Adyuvante Incompleto de Freund (FIA) y se administraron de la misma manera, en intervalos mensuales por 1 año. El muestreo de la sangre tuvo lugar a los 7 a 14 días después de cada refuerzo. Cada muestra se procesó para producir el suero que además se purificó por precipitación de ácido caprílico y sulfato de amonio para producir una fracción de inmunoglobulina G (IgG). La fracción IgG se evaluó por ensayo en placa de microtitulación competitivo, como se describe abajo.

Ejemplo - 14

Desarrollo de ELISAs competitivos para MDMA

Los pozos de una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pozos de enlace mejorado, se cubrieron con la fracción IgG del antisuero cultivado con el Inmunógeno 7 (Ejemplo 8), diluido en Tris 10 mM, pH 8.5 (125 µl/pozo). La dilución de cubierta del anticuerpo apropiado se determinó utilizando técnicas checkerboard de ELISA estándar. La placa se incubó por 2 horas a 37°C, se lavó 4 veces con solución salina estandarizada Tris que contiene Tween 20 (TBST) y se deja seca. Las soluciones estándar de MDMA se prepararon en TBST a 0, 1, 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/ml y 25 µl de cada una se adicionaron a los pozos apropiados (Figura 2). Los conjugados (reactivos de detección)-hapteno 7-HRP (Ejemplo 9) y hapteno 10-HRP (Ejemplo 12) - se diluyeron en solución reguladora Tris, pH 7.2, que contiene EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA, siendo las diluciones apropiadas determinadas por técnicas checkerboard de ELISA estándar, y 100 µl de cada una se adicionaron a los pozos apropiados (Figura 2). La placa se incubó a 37°C por 2 horas. El exceso de conjugado sin unir se eliminó, lavando 6 veces durante un periodo de 10 minutos con TBST.

125 µl de solución del sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) se adicionó a cada pozo de la placa, que luego se incubó por 15 a 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se terminó por la adición de 125 µl de H₂SO₄ 0.2 M a cada pozo. La absorbancia, luego se determinó a 450 nm utilizando un lector de placa de microtitulación. Los datos generados en cada ensayo se presentan en la Tabla 1 a continuación.

ES 2 316 520 T3

TABLA 1

Datos generados a partir de los ensayos en placa de microtitulación competitivos para MDMA empleando antisuero cultivado con el inmunógeno 7 (Ejemplo 8) y conjugado 7 (hapteno 7-HRP) (Ejemplo 9) y conjugado 10 (hapteno 10-HRP) (Ejemplo 12) como reactivos de detección

Concentración Estándar ng/ml	Conjugado 7		Conjugado 10	
	A ₄₅₀	%B/B ₀	A ₄₅₀ %	B/B ₀
0	2.470	100	2.37	100
1	2.060	83.4	2.041	86.1
10	1.432	58	1.405	59.3
50	0.857	34.7	0.815	34.4
100	0.642	26	0.671	28.3
250	0.393	15.9	0.465	19.6
500	0.269	10.9	0.341	14.4
1000	0.185	7.5	0.213	8.97
IC50	17		23.6	
A ₄₅₀ = absorbancia a 450nm				
B = absorbancia a 450nm a una concentración del estándar xng/ml				
B ₀ = absorbancia a 450nm a una concentración del estándar Ong/ml				
IC ₅₀ = concentración del estándar que produce 50% de B/B ₀				

Ejemplo - 15

Reacción cruzada de MDMA ELISAs competitivos

Con el fin de determinar la especificidad de los ELISAs competitivos MDMA, soluciones estándar de potenciales reactivo cruzado MDEA, MDA, d-anfetamina, (+)-metanfetamina, (+)-efedrina, (-)-efedrina, (+)-pseudoefedrina, (-)-pseudoefedrina y l-anfetamina se prepararon en TBST a 0, 500, 1000, 5000, 10000, 25000, 50000 y 100000 ng/ml. Empleando cada serie de estándares en los ELISAs competitivos MDMA, las curvas de calibración se generaron y estas se utilizaron para determinar la reacción cruzada de los inmunoensayos con estas drogas. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 2, siendo la reacción cruzada calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%CR = IC_{50MDMA} / IC_{50CR} \times 100$$

Donde %CR es el porcentaje de reacción cruzada, IC₅₀MDMA es la concentración de MDMA que causa 50% de desplazamiento de la señal e IC₅₀CR es la concentración de reactivos cruzados potenciales, para los cuales se evalúa %CR, que causa el 50% del desplazamiento de la señal.

Es evidente a partir de los resultados que los ensayos de MDMA muestran niveles altos de reacción cruzada con MDEA, niveles bajos de reacción cruzada con MDA y muy bajos niveles de reacción cruzada con d-anfetamina y (+)-metanfetamina. Por consiguiente, los ELISAs competitivos MDMA son altamente específicos para MDMA y otros análogos metilenodioxi.

TABLA 2

Reacción cruzada de los ELISA competitivos de MDMA

Prueba	Reactivo cruzado	Antisuero con inmunógeno 7 Hapteno 7-HRP	
		IC50 (ng/ml)	%CR
1	MDMA	17	100
	MDA	300	5.7
	d-Anfetamina	52199	0.03
	(+)-Metanfetamina	11138	0.15
	(+)-Efedrina	>100000	<0.017
	(-)-Efedrina	>100000	<0.017
	(+)-Pseudoefedrina	>100000	<0.017
	(-)-Pseudoefedrina	>100000	<0.017
2	MDMA	30	100
	MDEA	15	200
	l-Anfetamina	>30000	<0.1

Referencias citadas en la descripción

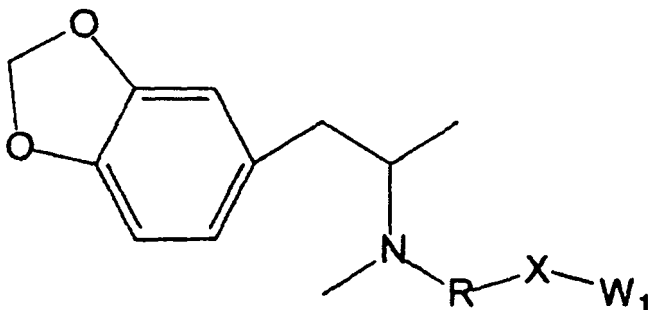
Esta lista de referencias citadas por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citadas en la descripción

- EP 0399184 A2 [0012] [0012] [0012]
- EP 820984 A [0012] [0012].

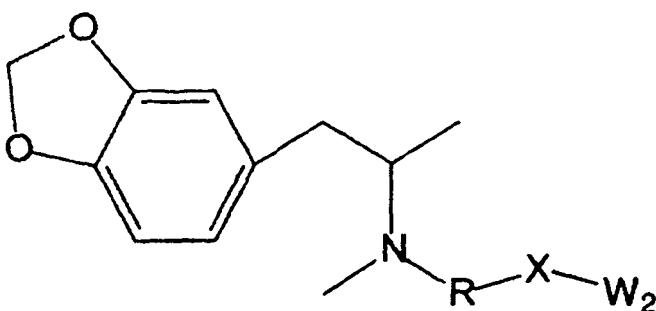
REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno de la siguiente fórmula estructural:



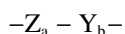
en la cual el agente reticulante comprende -R-X-, siendo R un primer grupo bivalente y siendo X un segundo grupo bivalente y en la cual W₁ es un material portador que confiere antigenicidad.

2. Un conjugado de la siguiente fórmula estructural:



en la cual el agente reticulante comprende -R-X-, siendo R un primer grupo bivalente y siendo X un segundo grupo bivalente y en la cual W₂ es un agente marcador que es detectable.

3. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en la cual R comprende:



en la cual Z es una fracción alquileno sustituida o no sustituida, de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada o un arileno sustituido o no sustituido, preferiblemente la fracción, fenileno; Y es una fracción alquileno sustituida o no sustituida, de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada; a es 0 o 1 y b es 0 o 1, con la condición que a y b no puedan ambos ser 0.

4. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la Reivindicación 3, en la cual b es 0, a es 1 y Z es una fracción alquileno C₁₋₆, sustituida o no sustituida, de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada.

5. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la Reivindicación 3 o 4, en el cual Z es una fracción alquileno C₃₋₄ no sustituida, de cadena lineal, saturada.

6. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, en la cual X se selecciona de un fracción de un ácido carboxílico o un éster de este, una amina, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster de este, un ácido tiocarboxílico o un éster de este, un aldehído, un piridilditio o una vinilsulfona.

7. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la Reivindicación 6, en el cual X se selecciona de un ácido carboxílico (-COOH), una amina (-NH₂) y un tiocarboxilato éster (-S-CO-CH₃).

8. Un inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 3 a 7, en el cual el material portador es una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semi-sintético.

9. Anticuerpos cultivados contra el inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 3 a 8, siendo los anticuerpos capaces de unirse con al menos un epítopo estructural de la 3,4-metilenodioximetanfetami-

ES 2 316 520 T3

na, preferiblemente con el epítipo estructural metilenodioxi y que tienen especificidad por MDMA y otro análogos metilenodioxi.

10. Un proceso de preparación de anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 9, proceso que comprende las etapas de inmunización de un animal no-humano, preferiblemente un animal vertebrado, más preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 3 a 8, y la recolección del suero resultante a partir del animal inmunizado.

11. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 7, en el cual el agente marcador se selecciona de una enzima, una sustancia luminescente, una sustancia radioactiva, o una mezcla de estas.

12. Un método para detectar o determinar MDMA y sus análogos metilenodioxi en una muestra, el método que comprende el contacto de la muestra con el conjugado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 7 o 11, o una mezcla de estos, y con los anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 9, o una mezcla de estos; la detección, o determinación de la cantidad de, conjugado unido; y la deducción, a partir de una curva de calibración, de la presencia de, o la cantidad de, MDMA y sus análogos metilenodioxi en la muestra.

13. Un conjunto para detectar o determinar MDMA y sus análogos metilenodioxi, el conjunto incluye el conjugado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 7 o 11, o una mezcla de estos y los anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 9 o una mezcla de estos.

14. Uso de los conjugados de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 7 o 11, o una mezcla de estos, con los anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 9, o una mezcla de estos, para detectar o determinar MDMA y sus análogos metilenodioxi en muestras de prueba tales como fluidos biológicos.

Figura-1: Reacción química para la preparación de haptenos 7,9 y 10

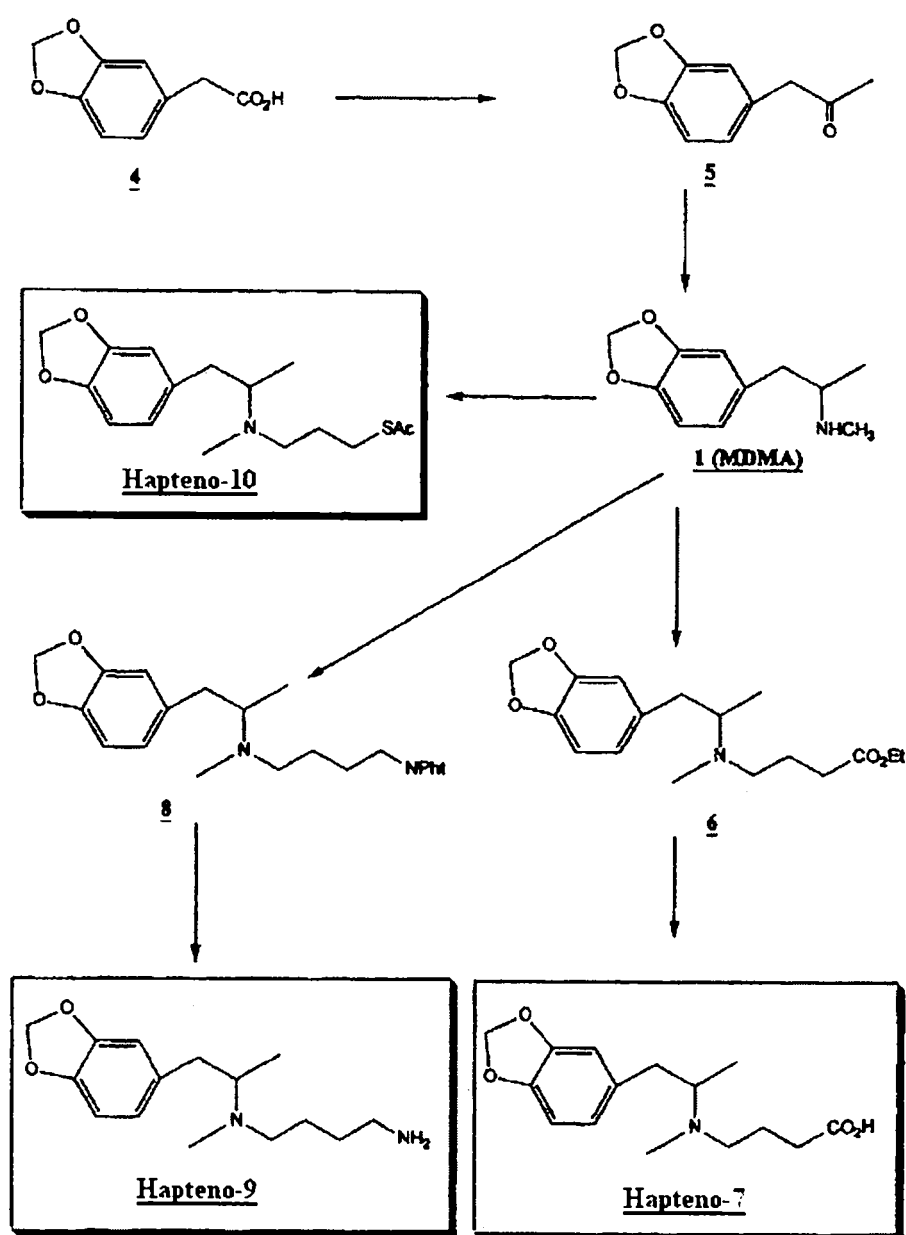


Figura-2: Ensayos de placa de microtitulación ELISA Competitivo para MDMA

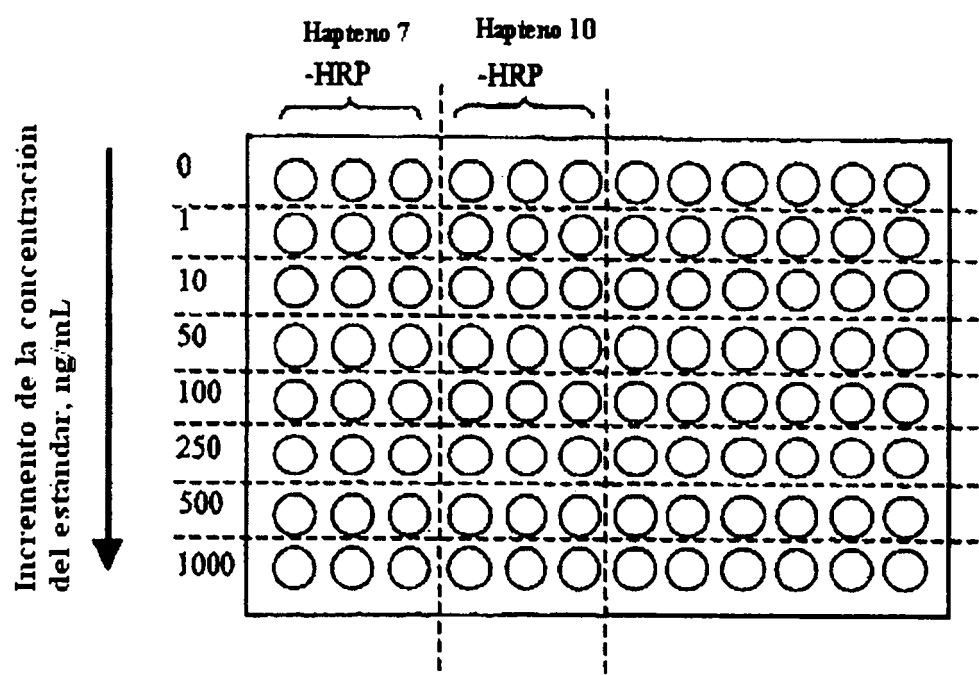


Figura-3: Material Portador BSA

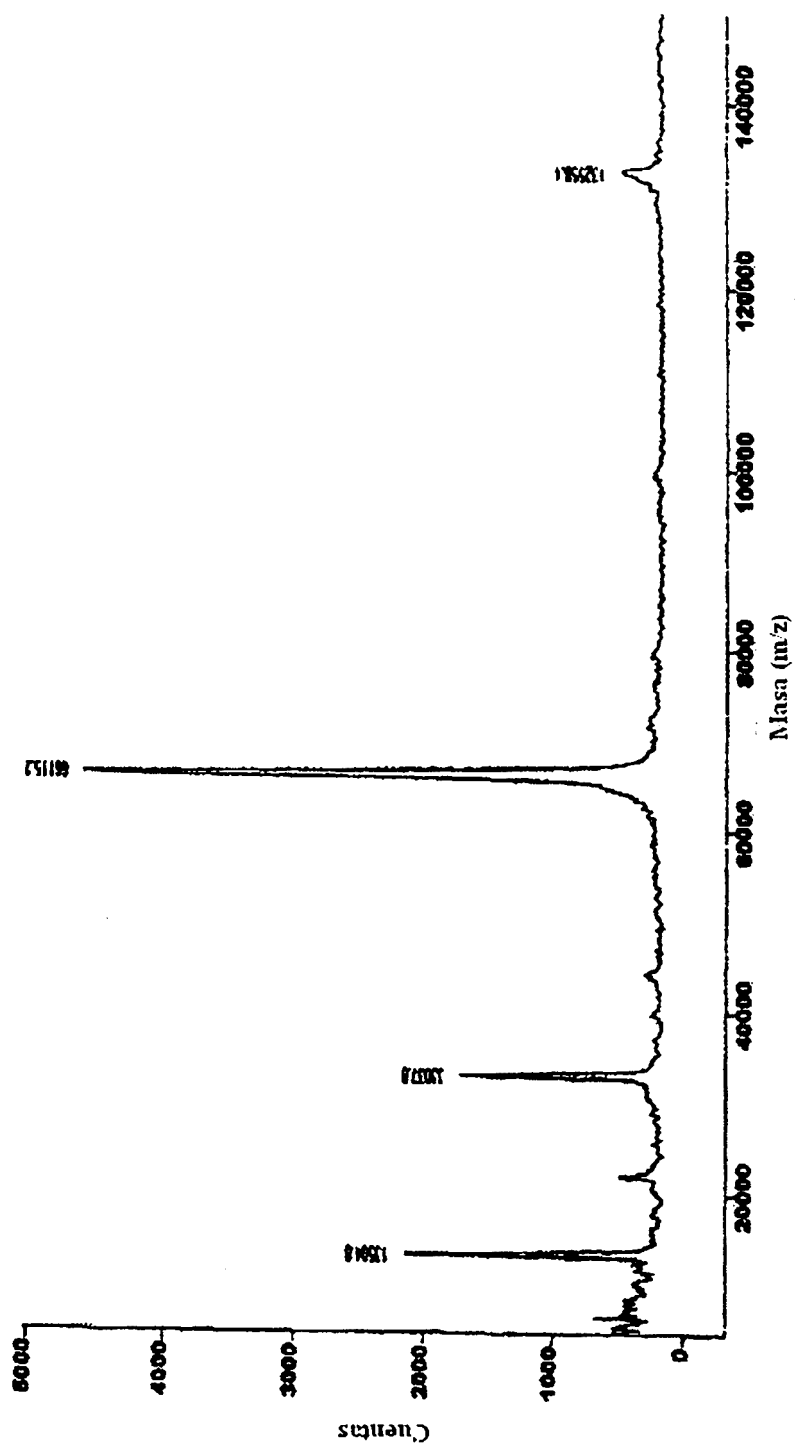


Figura-4: Inmunógeno 7

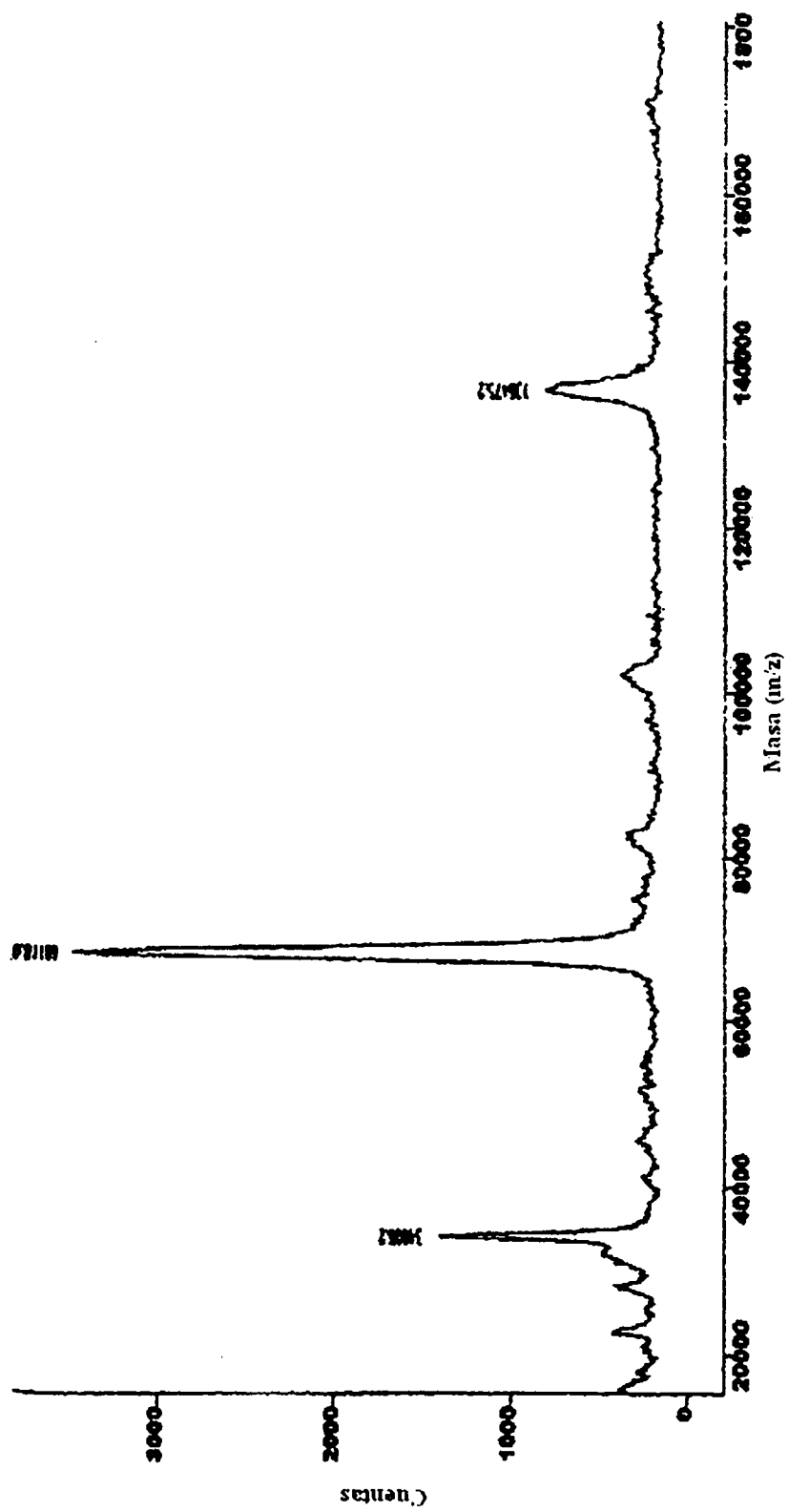


Figura-5

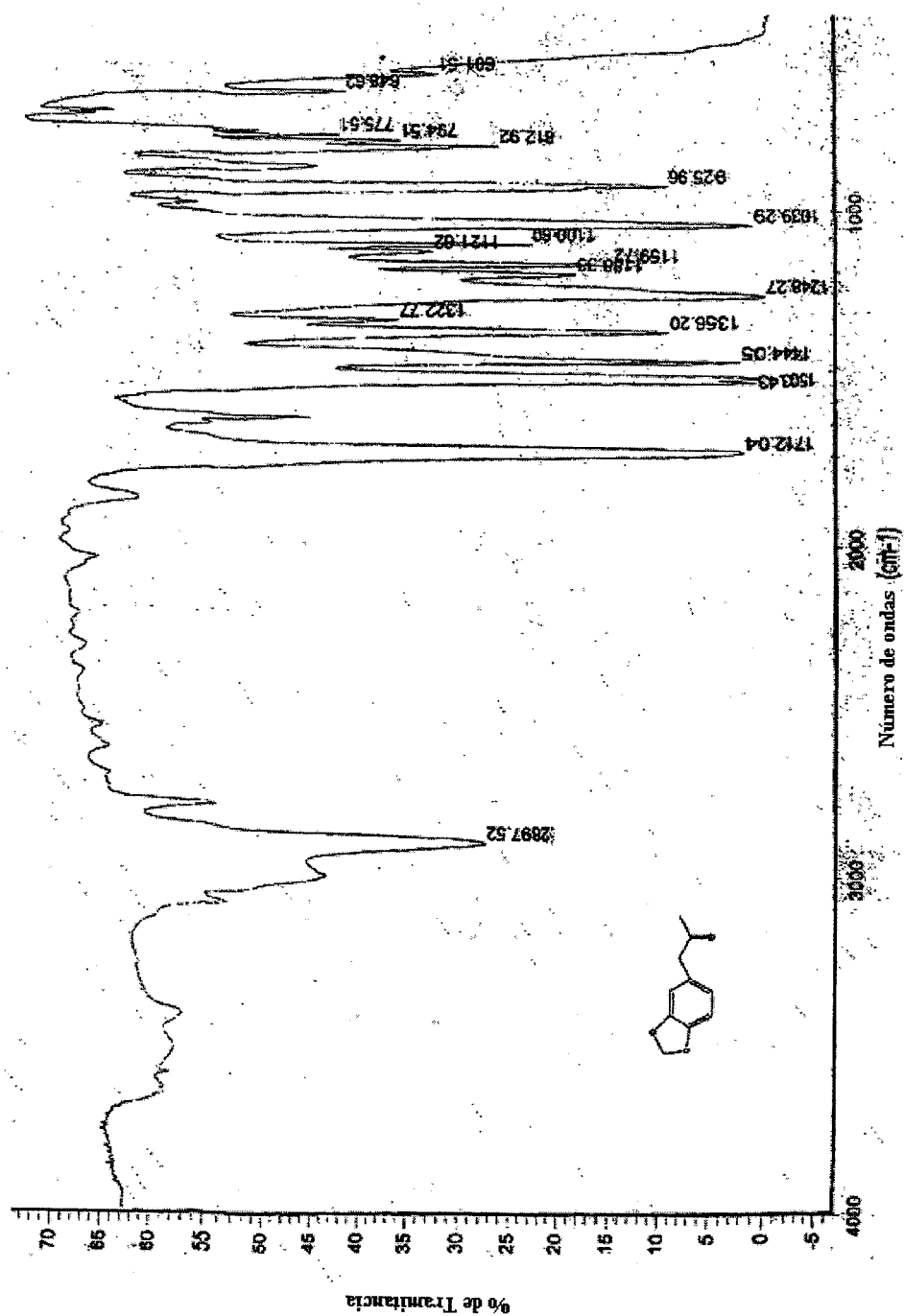


Figura-6

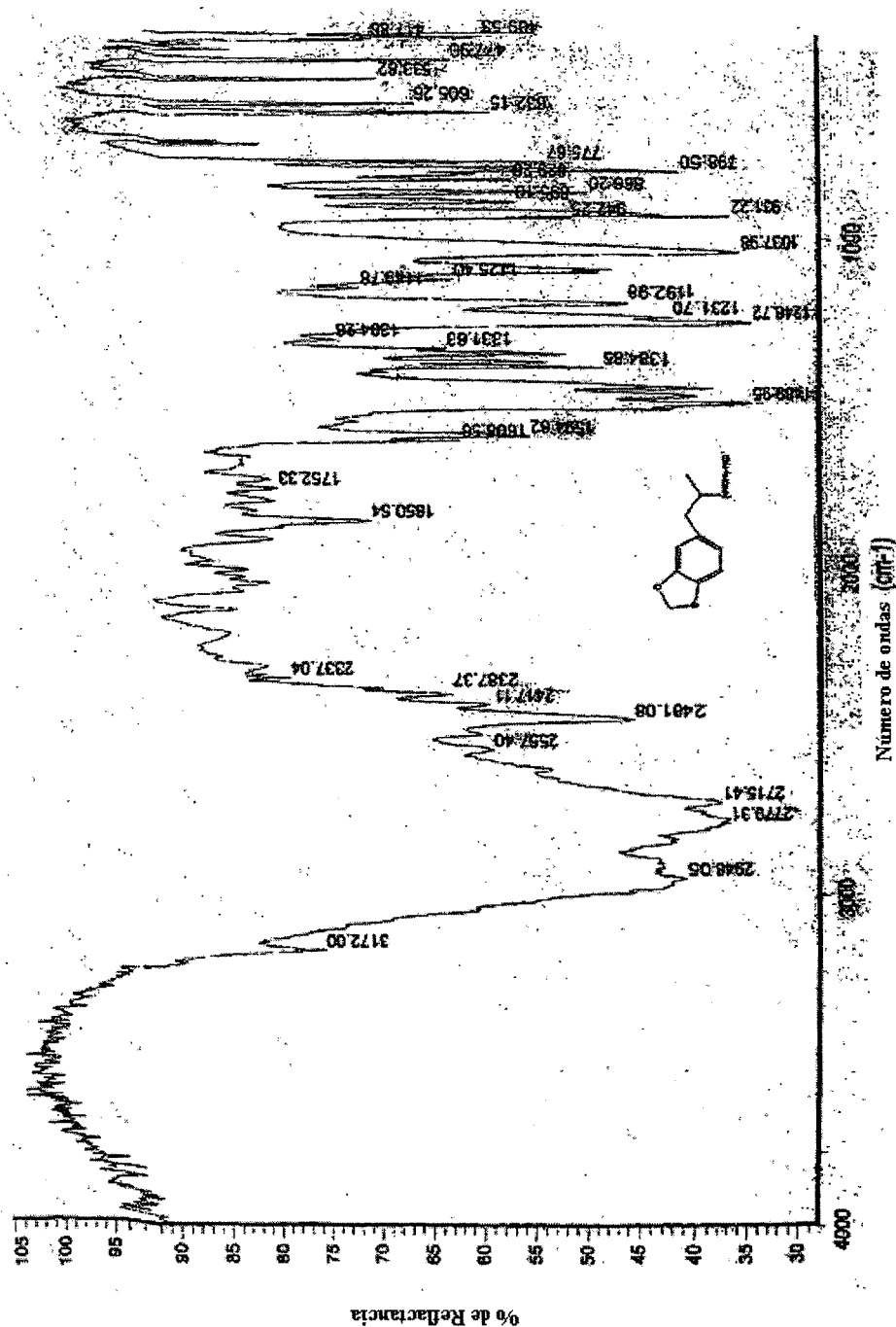


Figura-7

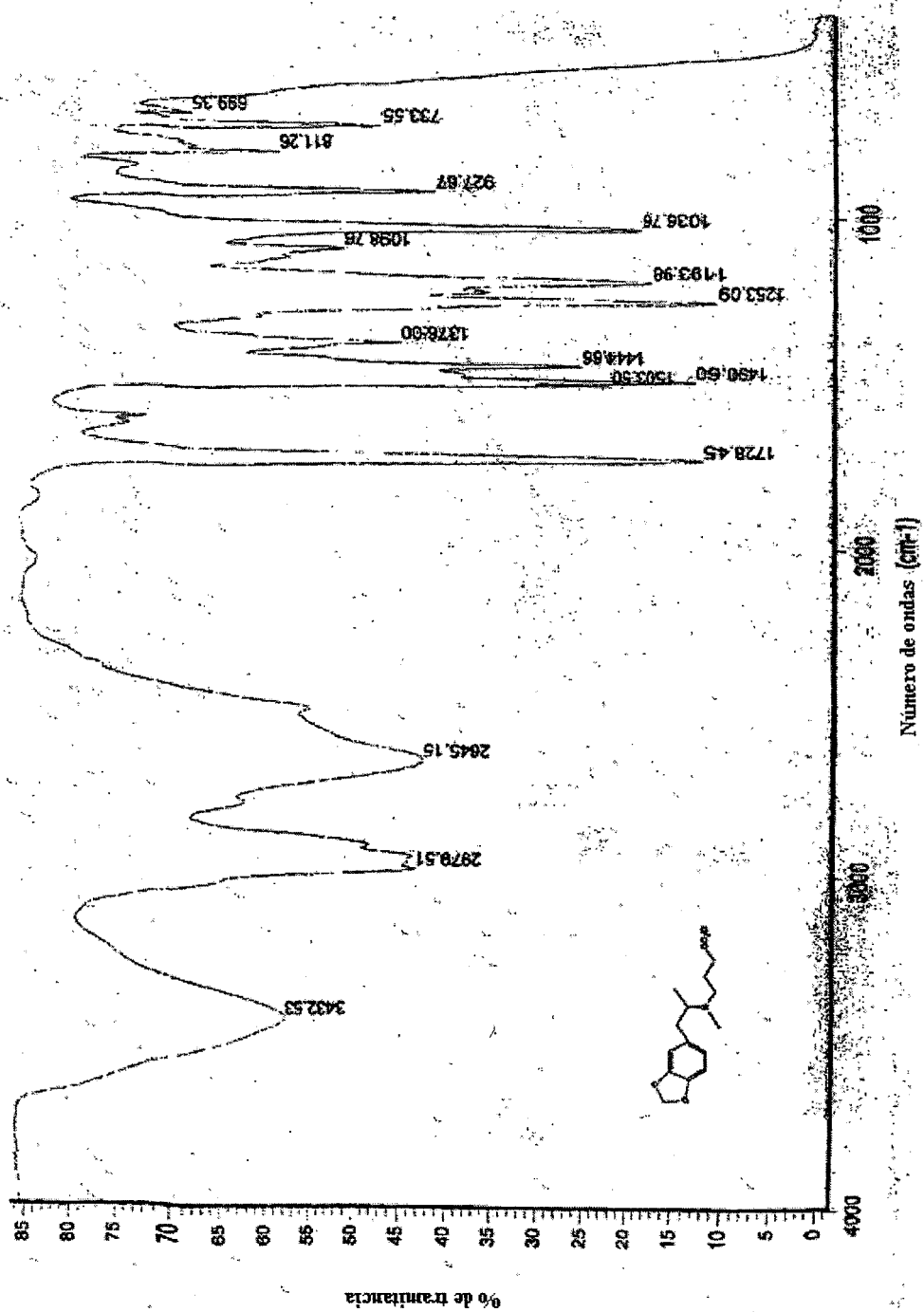


Figura-8

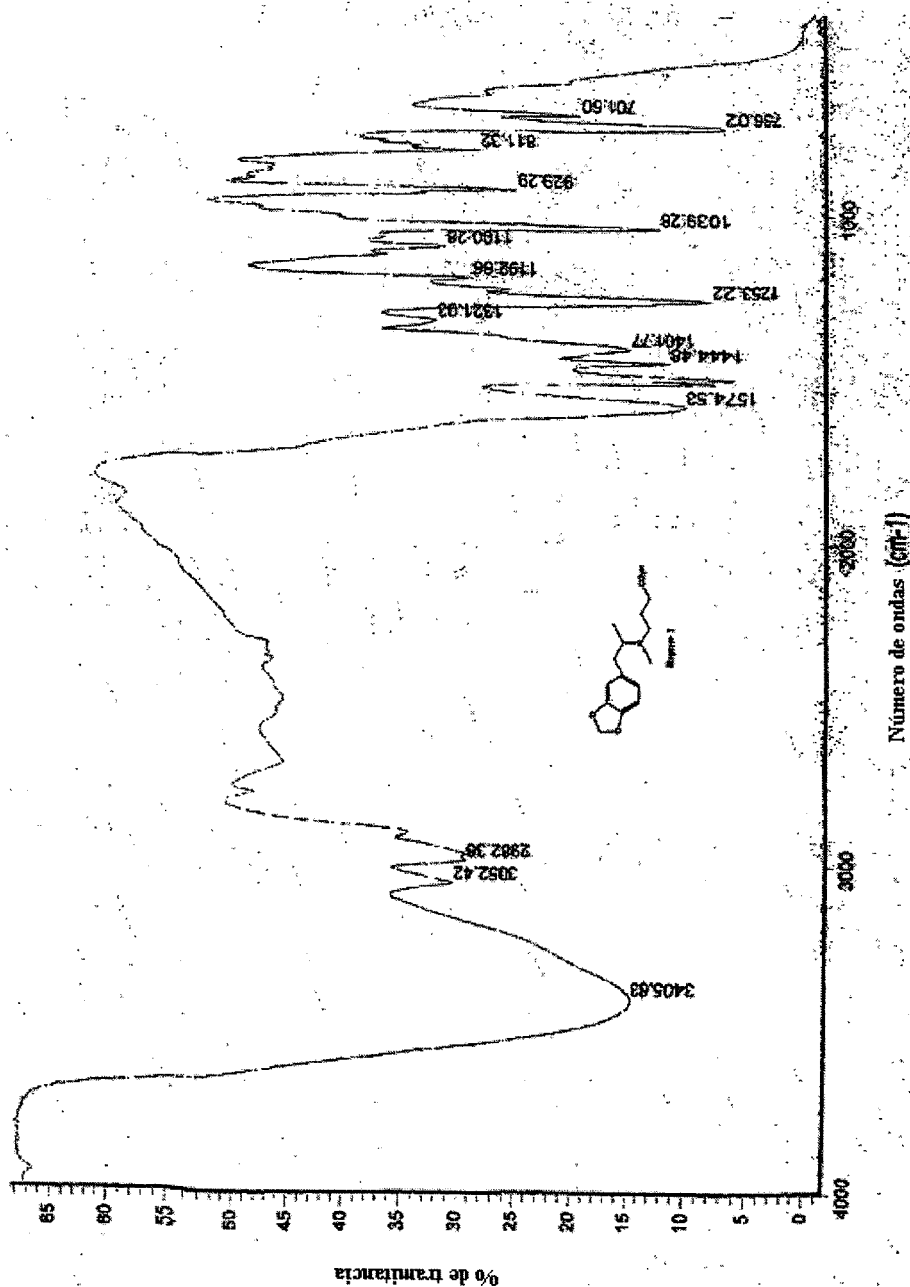


Figura-9

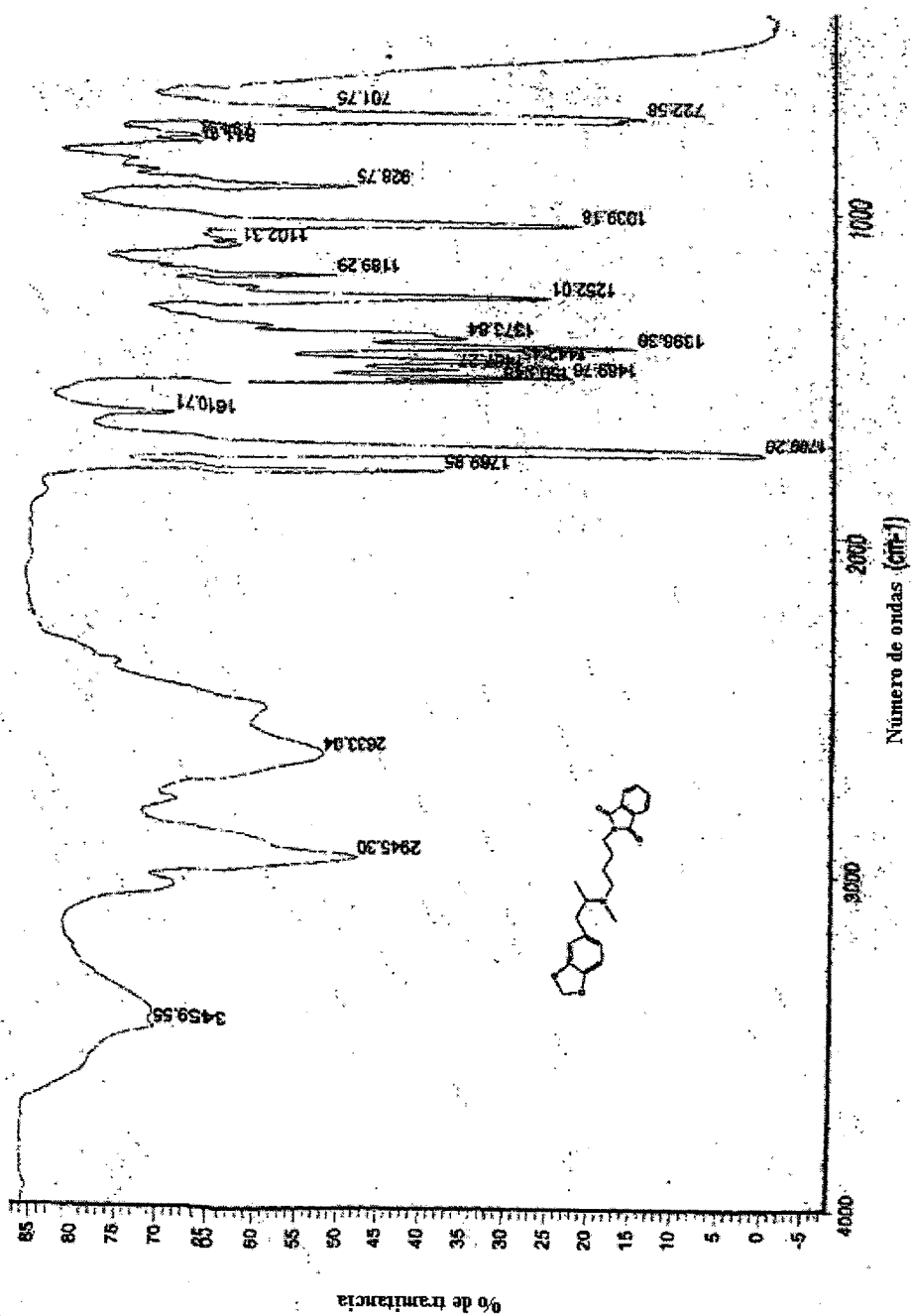


Figura-10

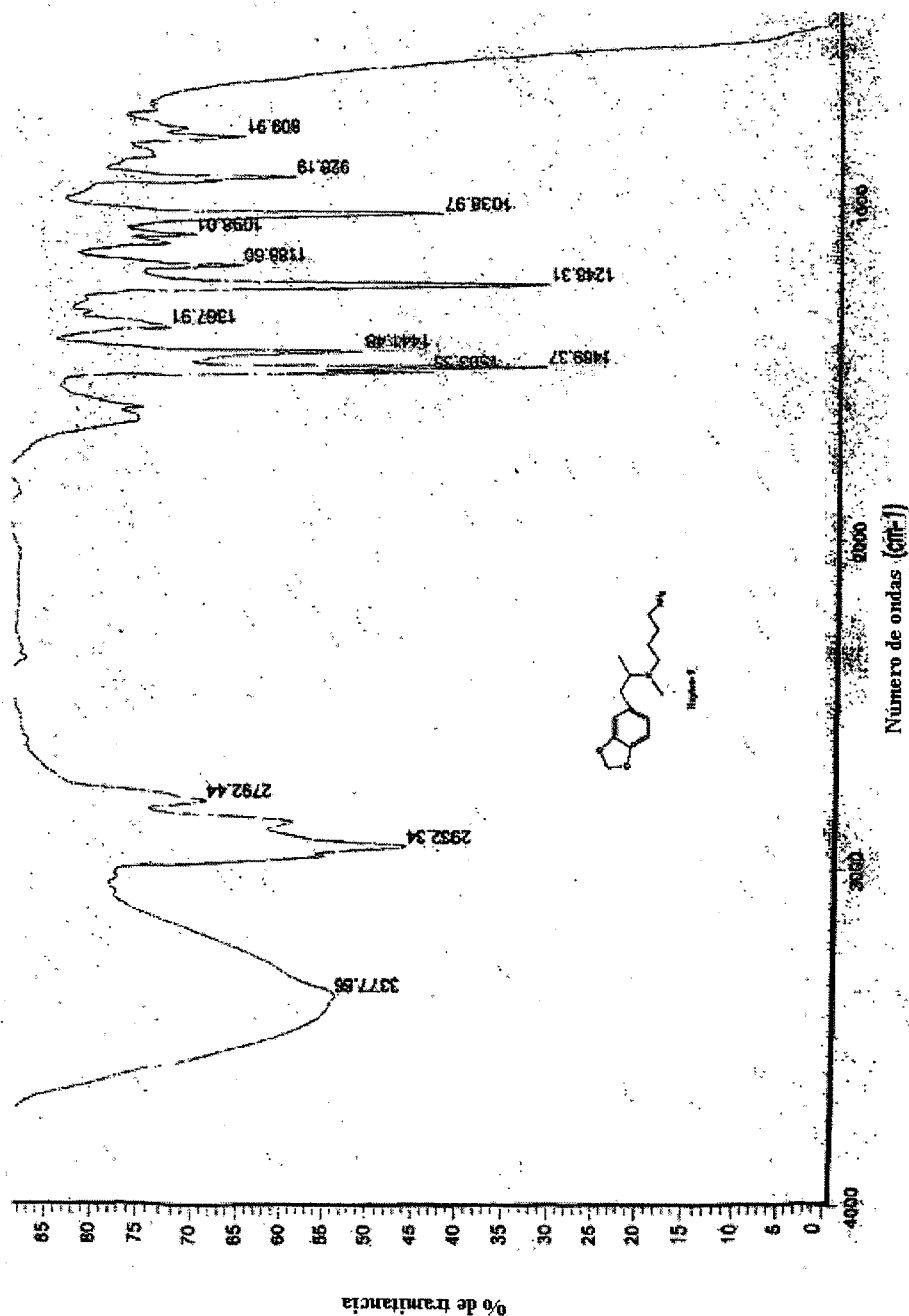


Figura-11

