



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 296 688**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01115342 .6**

(86) Fecha de presentación : **26.06.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1167976**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

(54) Título: **Inmunoensayo para la detección de anfetaminas y sus derivados.**

(30) Prioridad: **30.06.2000 US 608524**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es: **Mc Nally, Alan J.;**
Zhao, Huiru y
Goc-Szkutnicka, Krystyna

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 296 688 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

Inmunoensayo para la detección de anfetaminas y sus derivados.

5 Antecedentes del invento

El presente invento hace referencia en general al ámbito de la medición de un analito en un medio líquido. Más concretamente, hace referencia a un ensayo para la medición de una droga de abuso en una muestra biológica. En particular, el invento hace referencia a un método de inmunoensayo muy sensible para la detección de anfetaminas, metanfetaminas y metilendioxianfetaminas de síntesis tales como 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) en muestras biológicas.

Los análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina son una serie de compuestos conocidos como anfetaminas “de diseño”. Como se representa en la figura 1, estas drogas psicotrópicas son derivados de anillo sustituido relacionadas químicamente con la mescalina. Entre ellas figuran metilendioxianfetamina (MDA), metilendioximetanfetamina (MDMA, también conocida como éxtasis), metilendioxietilfetamina (MDEA), N-metilbenzodioxazol-yl-butanamina (MBDB), benzodioxazol-5'-yl-2-butanamina (BDB) y 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), siendo la MDMA la más común de ellas.

Se ha demostrado que la MDA es el metabolito tanto de la MDMA como de la MDEA. Varios estudios realizados en animales han demostrado que la MDMA se metaboliza por N-desmetilación, desaminación, O-metilación y O-conjugación con glucurónido y/o metabolitos sulfatados. En la orina se detectan la droga precursora (MDMA), 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), 3-hidroxi-4-metoximetanfetamina, 4-hidroxi-3-metoxifenilacetona, 3,4-metilendioxifenilacetona y 3,4-dihidroxifenilacetona. La mayoría de estos metabolitos también se encuentran presentes en la sangre.

Las matrices biológicas que se estudian más habitualmente para detectar MDMA, MDA, MDEA y MBDB son la orina y la sangre, y están muy documentadas en las publicaciones. Más recientemente, se ha informado de la determinación de estas drogas de síntesis en otras muestras biológicas como la saliva, el sudor y el pelo. En estas matrices, la droga precursora se detecta en concentraciones superiores que sus metabolitos.

El abuso de estas anfetaminas de síntesis está aumentando en todo el mundo, y su detección por medio de métodos de cribado se está convirtiendo en un asunto cada vez más importante. Zhao, H. *et al.*, J. Anal. Toxicology 25, 258-269 (2001) descubrió que el 71% de las muestras de orina procedentes de asistentes a fiestas “rave” contenían MDMA o MDA solas o combinadas con anfetamina u otras anfetaminas de síntesis como MDEA. En la actualidad, no existen inmunoensayos comerciales diseñados específicamente para la detección de estas sustancias y, por lo tanto, su detección depende de las reactividades cruzadas relativas que exhiben en el método de cribado de anfetamina y metanfetamina utilizado. En general, la reactividad cruzada de los ensayos para anfetamina y metanfetamina disponibles comercialmente con respecto a muchos de estos compuestos es baja, lo que sugiere la posibilidad de que algunas muestras positivas puedan pasar sin que se detecten.

Los inmunoensayos, en particular los ensayos de unión competitiva, han demostrado ser especialmente provechosos al hacer un análisis para detectar drogas de abuso. En los inmunoensayos de unión competitiva, un analito de una muestra biológica compite con un reactivo marcado, o análogo de analito o trazador, por un número limitado de sitios de unión a los receptores en anticuerpos específicos para el analito y el análogo de analito. Enzimas como β -galactosidasa y peroxidasa, moléculas fluorescentes como los compuestos de fluoresceína, compuestos radiactivos como ¹²⁵I, y las micropartículas son las sustancias marcadoras que se utilizan normalmente como trazadores. La concentración de analito en la muestra determina la cantidad de análogo de analito que se unirá al anticuerpo. La cantidad de análogo de analito que se unirá es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra porque el analito y el análogo de analito se unen al anticuerpo en proporción a sus respectivas concentraciones. La cantidad de análogo de analito libre o unido se puede determinar después con los métodos apropiados para la marca concreta que se está utilizando.

La cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) es muy específica y se ha descrito para detectar al mismo tiempo MDMA, MDA, anfetamina, metanfetamina, MDEA y sus metabolitos. Para confirmar y verificar los resultados de un ensayo inmunológico o de un presunto diagnóstico se requiere por lo general el análisis de CG/EM. Con esta técnica, se extrae la MDMA o las drogas de síntesis en fase sólida, después se derivatizan y se analizan por medio de CG/EM.

En la patente estadounidense n°. 5.501.987 expedida el 26 de marzo de 1996, Ordonez *et al.* describe un inmunoensayo de analito doble para la determinación de anfetamina y metanfetamina utilizando una única molécula de unión marcada que puede producir una reacción cruzada a distintas sensibilidades en anticuerpos procedentes de derivados conjugados de anfetamina y metanfetamina. Los calibradores utilizados se preparan añadiendo d-anfetamina a una orina normal humana libre de drogas.

Kunsman *et al.* (J. Analyt. Toxicol. 14, 1990, páginas 149-153) revelan la aplicación de inmunoensayos de anfetamina para la detección de metilendioxianfetaminas de síntesis. Como estándares, se utilizan soluciones de anfetamina.

Kunsman *et al.* no enseñan el uso de un estándar compuesto por una cantidad conocida de metilendioxianfetamina de síntesis.

EP-A-0.674.782 pertenece a la misma familia de patentes que la patente estadounidense n°. 5.262.333 y revela un inmunoensayo de polarización fluorescente para la determinación de anfetamina y metanfetamina en una muestra biológica. El procedimiento descrito incluye un tratamiento previo de la muestra biológica con periodato y una proteína de unión a riboflavina para eliminar reactivos cruzados tales como β -hidroxifenetilamina.

EP-A-0.375.422 describe un inmunoensayo que puede determinar la presencia de anfetaminas en una muestra sospechosa de contener anfetamina y/o metanfetamina mediante el empleo de al menos dos conjugados que constan cada uno de ellos de una marca funcionalmente similar unida a un análogo de anfetamina y un análogo de metanfetamina, respectivamente, y un anticuerpo unido a anfetamina y un anticuerpo unido a metanfetamina, en el que al menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal.

Ruangyuttikarn y Moody (J. Analyt. Toxicol. 12 (4): 229-223, 1988) revelan una comparación de tres inmunoensayos de anfetamina comerciales para la detección de metanfetamina, metilendioxianfetamina, metilendioximetanfetamina y metilen-dioxietilamfetamina. Todos los ensayos se calibraron con anfetamina como referencia.

Ward *et al.* (Journal of Forensic Sciences, 39 (6), 1994, páginas 1486-1496) revelan un radioinmunoensayo para la doble detección de anfetamina y metanfetamina. El método emplea anfetamina o metanfetamina como calibradores.

Cody y Schwarzhoff (J. Analyt. Toxicol. 17 (1993), páginas 26-30) describen un inmunoensayo de polarización fluorescente para la detección de anfetamina, metanfetamina y análogos de anfetamina. También este método utiliza anfetamina y metanfetamina como calibradores.

Resumen del invento

Para sorpresa de todos, se ha descubierto que se puede conseguir un método de inmunoensayo muy específico para la detección de anfetaminas, metanfetaminas, metilendioxianfetaminas de síntesis tales como 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) en muestras de orina mediante la utilización de un calibrador que consiste de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis en orina humana normal libre de drogas y un anticuerpo que tenga especificidad para la anfetamina o la metanfetamina y reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina.

El invento apunta a un método para determinar un analito seleccionado del grupo compuesto por anfetamina, metanfetamina y metilendioxianfetamina de síntesis en una muestra biológica, comprendiendo los pasos de:

a. Combinar una muestra sospechosa de contener dicho analito con un primer anticuerpo específico para anfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina, un segundo anticuerpo específico para metanfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina, y un complejo que comprenda un ligando de dicho analito unido a una fracción de marcado.

b. Medir la presencia o la cantidad del complejo que continúa unido o no unido a esos anticuerpos como consecuencia de un desplazamiento competitivo del analito, y

c. Comparar la presencia o la cantidad del complejo medido en el paso (b) con la presencia o la cantidad de un complejo similar medido en una muestra de referencia que contenga una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis, siendo tratada la muestra de referencia de acuerdo con los pasos (a) y (b).

El invento también se refiere a un método para determinar un analito seleccionado del grupo compuesto por anfetamina, metanfetamina y metilendioxianfetaminas de síntesis en una muestra biológica, comprendiendo los pasos de:

a. Combinar una muestra sospechosa de contener dicho analito con un anticuerpo seleccionado del grupo compuesto por anticuerpos específicos para anfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina y anticuerpos específicos para metanfetaminas y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina, y además con un complejo que comprenda un ligando del analito unido a una fracción de marcado.

b. Medir la presencia o la cantidad del complejo que continúa unido o no unido a esos anticuerpos como consecuencia de un desplazamiento competitivo del analito, y

c. Comparar la presencia o la cantidad del complejo medido en el paso (b) con la presencia o la cantidad de un complejo similar medido en una muestra de referencia que contenga una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis, siendo tratada la muestra de referencia de acuerdo con los pasos (a) y (b).

En ambos métodos, como muestra se utiliza preferentemente orina, y como sustancia presente en una muestra de referencia en una cantidad conocida se utiliza preferentemente 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).

En el método del invento, se combina una muestra sospechosa de contener anfetamina, metanfetamina o una droga relacionada estructuralmente con un anticuerpo que tenga especificidad para la anfetamina o la metanfetamina y una molécula de unión marcada que pueda interactuar con la combinación de anticuerpo y su correspondiente analito con el fin de detectar la presencia de los analitos en niveles de corte seleccionados, ya sea solos o combinados. El anticuerpo o anticuerpos concretos utilizados deben tener reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina. El presente invento se puede utilizar con cualquier tipo de formato de inmunoensayo, por ej.: ensayo de aglutinación turbidométrico, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de polarización fluorescente. Se prefiere utilizar el presente invento en especial con formatos aglutinométricos que admitan un método instrumental para la medición de los cambios ocasionados por la reacción de aglutinación. Para el mencionado análisis aglutinométrico, cabe utilizar tanto aparatos de ensayo manuales como automáticos. Por regla general, el instrumental automático funcionará utilizando multitud de recipientes o depósitos de reactivos de los que se extraerá con una pipeta la cantidad oportuna de cada reactivo para añadirla a la muestra. En el caso de inmunoensayos como el ensayo de aglutinación en cuestión, esto supondrá por lo general al menos dos de tales recipientes; normalmente, uno para un reactivo de anticuerpo y el otro para las micropartículas unidas con el ligando correspondiente. En algunos instrumentos que contengan diluyente, tampones u otros aditivos para un tratamiento apropiado de la muestra, puede haber más contenedores o depósitos.

El analizador clínico pipetea los reactivos y las muestras incorporados, que se introducen en una cubeta donde se produce la reacción de aglomeración competitiva y se realiza la medición de la turbidez. Por ejemplo, con el analizador HITACHI 917 (Roche Diagnostics) y el equipo de reactivos ABUSCREEN® OnLine Amphetamines (Roche Diagnostics, n.º. de cat. 1985965), la muestra de orina se pipetea en la cubeta con diluyente de muestra, seguida inmediatamente por la cantidad adecuada de reactivo y mezcla de anticuerpo. Se hace una lectura espectrofotométrica inicial. Después, se transfiere a la cubeta la cantidad apropiada de reactivo de micropartículas y se mezcla la reacción. Tras una breve incubación, se realiza una última medición de la turbidez. El cambio total en la turbidez (absorbancia) de la reacción se compara con una curva de calibración y los resultados se presentan en ng/ml.

El presente invento incluye asimismo un kit de reactivos de ensayo que comprende, en un envase combinado, un anticuerpo específico para anfetamina, un anticuerpo específico para metanfetamina, un complejo que consta de un ligando de anfetamina o un derivado de anfetamina unido a una fracción de marcado, y un calibrador que comprende una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis. Este kit de ensayo ofrece reactivos de ensayo con una sensibilidad clínica mayor para detectar MDMA y compuestos relacionados estructuralmente.

El presente invento se refiere a un equipo para llevar a cabo un ensayo con objeto de determinar un analito seleccionado del grupo compuesto por anfetamina, metanfetamina y metilendioxianfetaminas de síntesis en una muestra biológica, comprendiendo en un envase combinado:

a. Un primer anticuerpo específico para anfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina,

b. Un segundo anticuerpo específico para metanfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina,

c. Un complejo que consta de un ligando de anfetamina o un derivado de anfetamina unido a una fracción de marcado, y

d. Un calibrador que comprende una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis.

El invento hace referencia además a un equipo para llevar a cabo un ensayo con objeto de determinar un analito seleccionado del grupo compuesto por anfetamina, metanfetamina y metilendioxianfetaminas de síntesis en una muestra biológica, comprendiendo en un envase combinado:

a. Un anticuerpo seleccionado del grupo compuesto por anticuerpos específicos para anfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina y anticuerpos específicos para metanfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina,

b. Un complejo que consta de un ligando de anfetamina o un derivado de anfetamina unido a una fracción de marcado, y

c. Un calibrador que comprende una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis.

Ambos equipos se utilizan preferentemente con orina como muestra biológica. Preferentemente, la sustancia que contiene el calibrador en ambos equipos en una cantidad conocida es 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las estructuras de la anfetamina, la metanfetamina y las metilendioxianfetaminas de síntesis;

5 La figura 2 muestra una curva de respuesta a una dosis generada utilizando el ensayo del presente invento que comprende un anticuerpo específico para anfetamina, un anticuerpo específico para metanfetamina y calibradores que contienen cantidades conocidas de MDMA;

10 La figura 3 muestra una curva de respuesta a una dosis generada utilizando el ensayo del presente invento, que comprende un anticuerpo específico para anfetamina, un anticuerpo específico para metanfetamina y calibradores que contienen cantidades conocidas de MDA.

Descripción detallada del invento

15 En la actualidad, no se dispone de equipos de inmunoensayo comerciales para la determinación de MDMA. La única forma de establecer la MDMA a través de un inmunoensayo es utilizar reactivos o un kit de reactivos para determinar anfetamina o metanfetamina que comprenda un anticuerpo anfetamínico y un anticuerpo metanfetamínico con alta reactividad cruzada con la MDMA, y utilizando anfetamina o metanfetamina como calibrador. En el presente invento se utiliza una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis para calibrar un ensayo disponible comercialmente que utiliza anticuerpos para anfetamina y metanfetamina. El uso de un calibrador de metilendioxianfetamina de síntesis aumentó de manera significativa la sensibilidad clínica a la MDMA, MBDB, MDA, MDE y BDB sin que se produjera un aumento importante de la sensibilidad a medicamentos como las β -hidroxifenilaminas, por ej., efedrina, pseudoefedrina, fentamina, tiramina y fenilpropanolamina (PPA).

Abreviaturas utilizadas

AMP	anfetamina
BDB	($\pm$)-(3,4-metilendioxifenil)-2-butanamina
30 HMMA	4-hidroxi-3-metoximetanfetamina
MAMP	metanfetamina
35 MBDB	($\pm$)-N-metil-1-(3,4-metilendioxifenil)-2-butanamina
MDA	($\pm$)-3,4-metilendioxianfetamina
MDEA	($\pm$)-3,4-metilendioxietilamfetamina
40 MDMA	($\pm$)-3,4-metilendioximetanfetamina
NT	no ensayado
45 PPA	fenilpropanolamina.

En la tabla que figura más abajo se indican las reactividades cruzadas de los análisis comercializados en la actualidad para MDMA y MDA, de acuerdo con la bibliografía publicada, así como las reactividades cruzadas con el método del presente invento.

50 Por "metilendioxianfetaminas de síntesis" se entiende el grupo de análogos de anfetamina de metilendioxifenilalquilamina, entre los que figuran 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA, éxtasis), 3,4-metilen-dioxietilamfetamina (MDEA), N-metil-1-(3,4-metilendioxifenil)-2-butanamina (N-metilbenzodioxazol-yl-butanamina) (MBDB) y 3,4-metilendioxifenil-2-butanamina (benzodioxazol-5'-yl-2-butanamina) (BDB).

55

60

65

ES 2 296 688 T3

	Compuesto	Roche Hitachi	Roche Integra	Abott TDX	CEDIADAUAMP	Roche Hitachi
5		AMP 500 ng/ml	AMPSC 500	AMP/methAMP	1000 ng/ml	AMP/MDMA 300
			ng/ml	1000 ng/ml		ng/ml
10	MDMA	36%	79%	97%	69%	100,0%
	MDA	35,5%	40%	148%	1,9%	25,0%
15	MDEA	NT	NT	42,7%	2,4%	15,0%
	MBDB	NT	NT	(+)	NT	70,0%
20	BDB	NT	NT	(+)	NT	4,7%
	d-AMP	100%	100%	100%	101%	97,0%
25	l-AMP	6%	4,2%	56,9%	3,0%	3,8%
	d-MAMP	82,2%	12%	97,8%	100%	300,0%
30	l-MAMP	0,8%	12%	7,2%	12%	18%
	dl-efedrina	< 0,1%	< 0,1%	NT	0,4%	< 0,3%
35	I-PPA	1,5%	1,1%	NT	NT	0,6%
	HMA	NT	NT	NT	NT	< 0,3

Los niveles de corte que se indican para cada método en el cuadro anterior son la concentración de drogas en la muestra necesaria para que el análisis determine un resultado positivo.

Ejemplo 1

Preparación de un reactivo de anticuerpo

Se preparó un primer reactivo de acuerdo con las instrucciones que acompañan al kit de reactivos ABUSCREEN® OnLine HS Amphetamine/MDMA (Roche Diagnostics, n°. de cat. 1986619). El reactivo contenía anticuerpos monoclonales de anfetamina y metanfetamina (ratón) en un tampón con seroalbúmina bovina y un conservante.

Ejemplo 2

Preparación de un reactivo de micropartículas

Se preparó un segundo reactivo de acuerdo con las instrucciones que acompañan al kit de reactivos ABUSCREEN® OnLine HS Amphetamine/MDMA (Roche Diagnostics, n°. de cat. 1986619). El reactivo contenía un derivado de anfetamina conjugado con micropartículas de látex en un tampón con un conservante.

Ejemplo 3

Preparación de un calibrador de MDMA

Los calibradores se prepararon de acuerdo con las instrucciones que acompañan a los calibradores de MDMA de ABUSCREEN® OnLine Preciset® (Roche Diagnostics, n°. de cat. 4745556). Las soluciones calibradoras contenían 3,4-metilen dioximetanfetamina en orina humana con un conservante. Las concentraciones finales de los calibradores fueron 0, 150, 300 y 600 ng/ml.

ES 2 296 688 T3

Ejemplo 4

Ensayo utilizando un calibrador de MDMA

5 Los calibradores o muestras de referencia preparados conforme al Ejemplo 3 se analizaron de acuerdo con las instrucciones que acompañan al kit de reactivos OnLine utilizando un analizador HITACHI 917 (Roche Diagnostics) y un valor de corte de 300 ng/ml. Los parámetros utilizados fueron 10 μ g de muestra, 160 μ g de reactivo de anticuerpo y 90 μ g de reactivo de micropartículas. La reacción se efectuó de forma monocromática (505 nm) en el punto de equivalencia (punto de lectura 19-33). La curva de respuesta a la dosis se muestra en la figura 2, con el cambio de
10 absorbancia a 505 nm representado en el eje y, y la concentración de MDMA representada en el eje x.

Ejemplo 5

Ensayo utilizando un calibrador de MDMA

15 Los calibradores o muestras de referencia preparados como se describe en el Ejemplo 3, salvo por utilizar MDA en lugar de MDMA, se analizaron de acuerdo con las instrucciones que acompañan al kit de reactivos OnLine utilizando un analizador HITACHI 717 (Roche Diagnostics). Los parámetros utilizados fueron 10 μ g de muestra, 160 μ g de reactivo de anticuerpo y 80 μ g de reactivo de micropartículas. La reacción se efectuó de forma monocromática (505 nm) en el punto de equivalencia (27-50). La curva de respuesta a la dosis obtenida se muestra en la figura 3, con el
20 cambio de absorbancia a 505 nm representado en el eje y, y la concentración de MDA representada en el eje x.

Las reactividades cruzadas observadas cuando se utilizó MDA como calibrador fueron las siguientes:

25	Compuesto	Roche Hitachi AMP/MDMA 300 ng/ml
	MDMA	81,0%
30	MDA	100,0%
	d-AMP	319,0%
35	l-AMP	15,2%
	d-MAMP	269,0%
40	l-MAMP	24,7%
	dl-efedrina	0,34%
45	l-PPA	6,2%

Ejemplo 6

Ensayo de muestras de orina

50 Se trataron muestras sospechosas de contener anfetamina, metanfetamina o metilendioxianfetaminas de síntesis, de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, utilizando calibradores de MDMA a niveles de 0, 150, 300 y 600 ng/ml. Los resultados se obtuvieron comparando el cambio de absorbancia a 505 nm en una muestra desconocida con el obtenido con los calibradores de la concentración conocida. Los resultados obtenidos en 72 muestras de orina
55 tuvieron una concordancia del 100% con un método cromatográfico de referencia para la detección de anfetaminas de síntesis.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar un analito seleccionado del grupo compuesto por anfetamina, metanfetamina y metilendioxianfetaminas de síntesis en una muestra biológica, comprendiendo los pasos de:
 - a. Combinar una muestra sospechosa de contener dicho analito con un primer anticuerpo específico para anfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina, un segundo anticuerpo específico para metanfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina, y un complejo comprendiendo un ligando de dicho analito unido a una fracción de marcado,
 - b. Medir la presencia o la cantidad del complejo que continúa unido o no unido a tales anticuerpos como consecuencia de un desplazamiento competitivo del analito, y
 - c. Comparar la presencia o la cantidad del complejo medido en el paso (b) con la presencia o la cantidad de un complejo similar medido en una muestra de referencia conteniendo una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis, siendo tratada la muestra de referencia de acuerdo con los pasos (a) y (b).
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es orina.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la sustancia es 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).
4. Método para determinar un analito seleccionado del grupo compuesto por anfetamina, metanfetamina y metilendioxianfetaminas de síntesis en una muestra biológica, comprendiendo los pasos de:
 - a. Combinar una muestra sospechosa de contener dicho analito con un anticuerpo seleccionado del grupo compuesto por anticuerpos específicos para anfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina y anticuerpos específicos para metanfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina, y además con un complejo comprendiendo un ligando del analito unido a una fracción de marcado,
 - b. Medir la presencia o la cantidad del complejo que continúa unido o no unido a tal anticuerpo como consecuencia de un desplazamiento competitivo del analito, y
 - c. Comparar la presencia o la cantidad del complejo medido en el paso (b) con la presencia o la cantidad de un complejo similar medido en una muestra de referencia conteniendo una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis, siendo tratada la muestra de referencia de acuerdo con los pasos (a) y (b).
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la muestra es orina.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la sustancia es 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).
7. Equipo para realizar un ensayo con objeto de determinar un analito seleccionado del grupo compuesto por anfetamina, metanfetamina y metilendioxianfetaminas de síntesis en una muestra biológica, comprendiendo en un envase combinado:
 - a. Un primer anticuerpo específico para anfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina,
 - b. Un segundo anticuerpo específico para metanfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina,
 - c. Un complejo consistente en un ligando de anfetamina o un derivado de anfetamina unido a una fracción de marcado, y
 - d. Un calibrador consistente en una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis.
8. Equipo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la muestra es orina.
9. Equipo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la sustancia es 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).
10. Equipo para realizar un ensayo con objeto de determinar un analito seleccionado del grupo compuesto por anfetamina, metanfetamina y metilendioxianfetaminas de síntesis en una muestra biológica, comprendiendo en un envase combinado:

ES 2 296 688 T3

a. Un anticuerpo seleccionado del grupo compuesto por anticuerpos específicos para anfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina y anticuerpos específicos para metanfetamina y con reactividad cruzada con análogos de anfetamina de metilendioxifenilalkilamina,

5 b. Un complejo consistente en un ligando de anfetamina o un derivado de anfetamina unido a una fracción de marcado, y

c. Un calibrador consistente en una cantidad conocida de una sustancia seleccionada del grupo compuesto por metilendioxianfetaminas de síntesis.

10

11. Equipo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la muestra es orina.

12. Equipo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la sustancia es 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

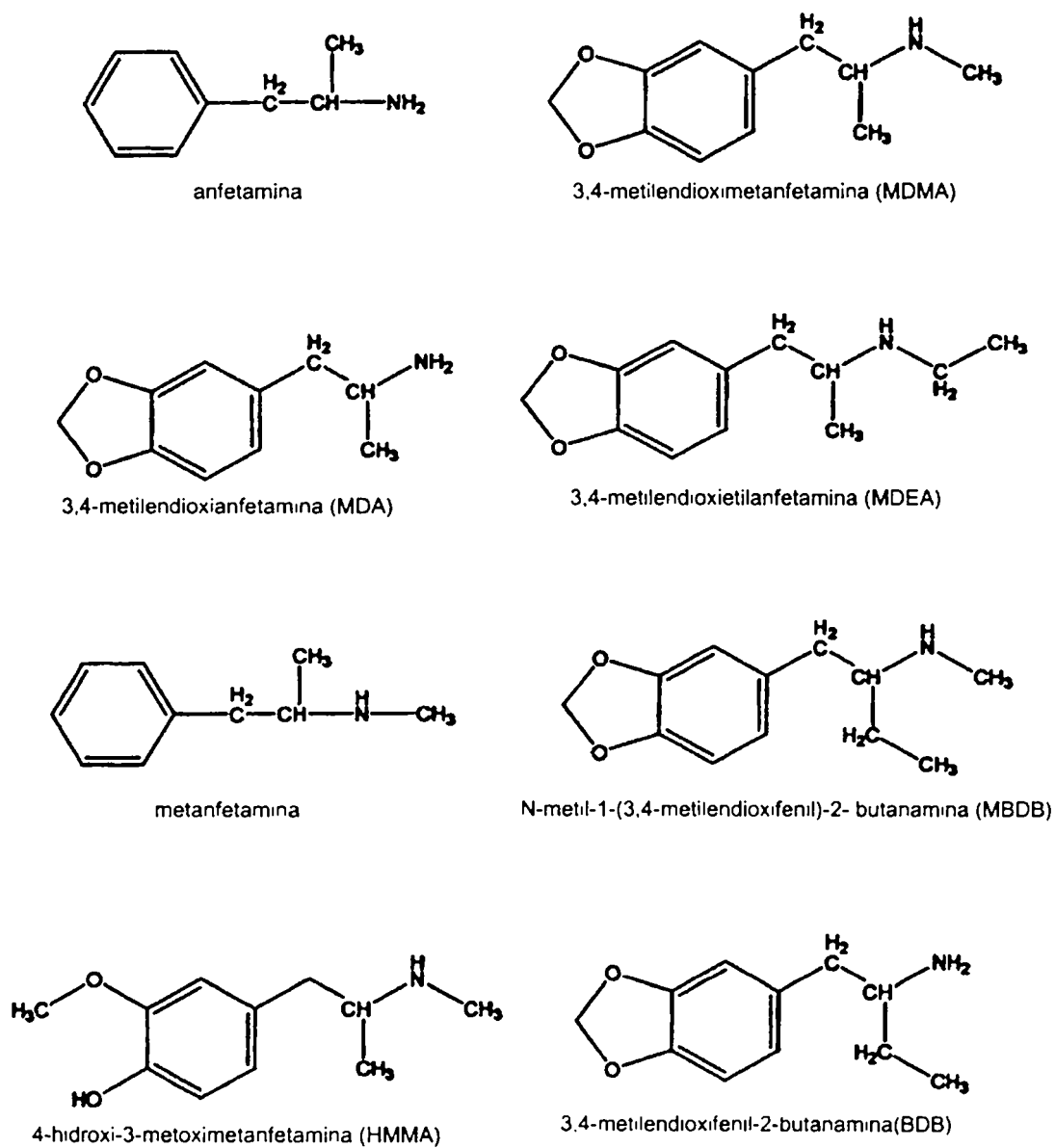


FIGURA 1

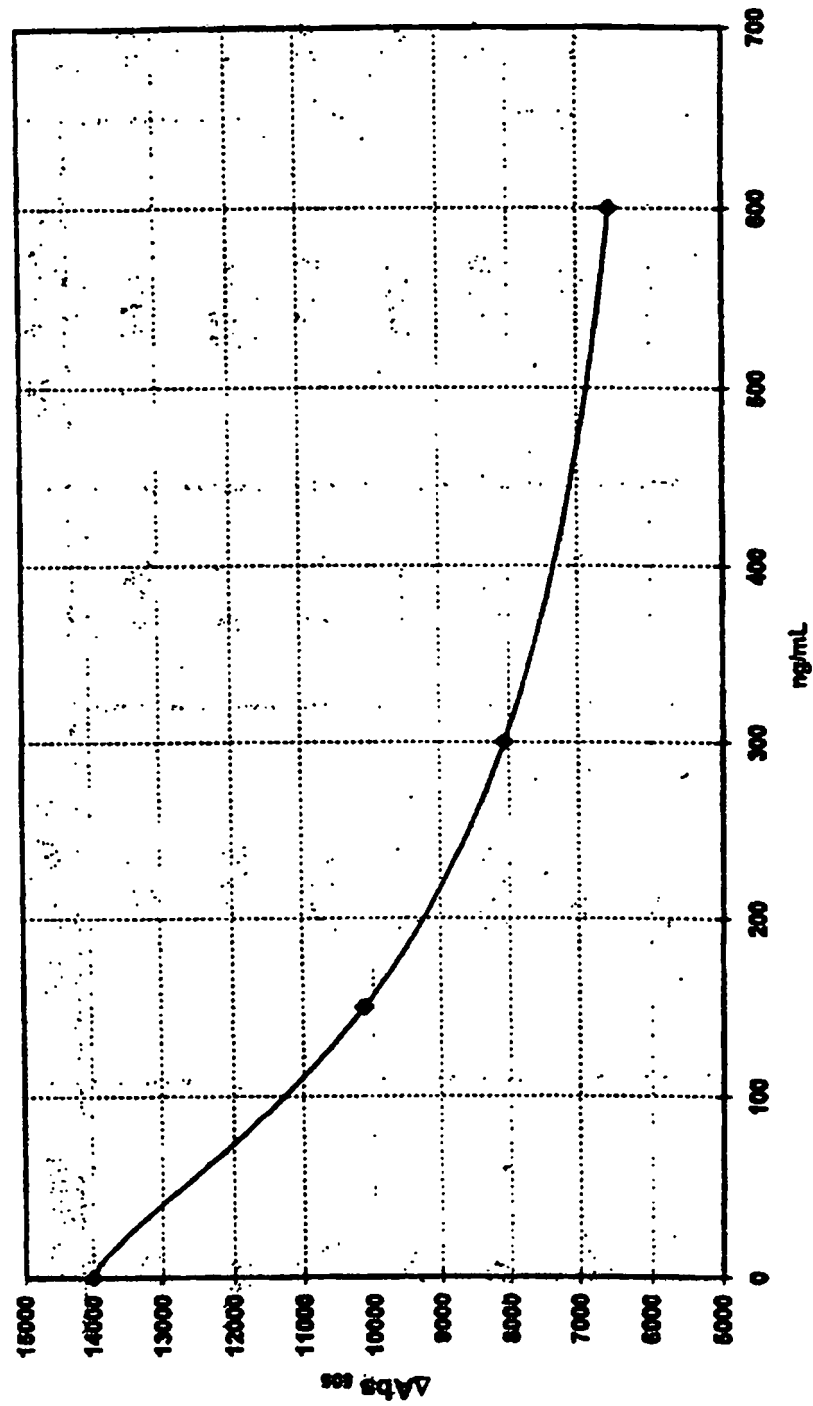


FIGURA 2

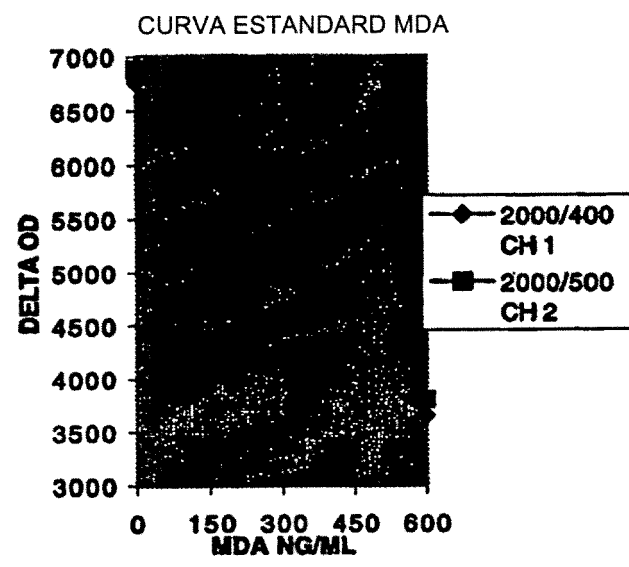


FIGURA 3