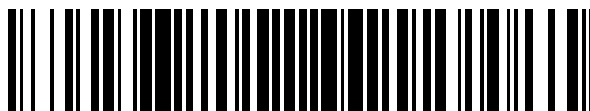


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 896**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2010** **E 10152365 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2353613**

54 Título: **Inmunoensayo de zolpidem con ventana de detección extendida**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2014

73 Titular/es:

RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
Ardmore, 55 Diamond Road
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB

72 Inventor/es:

LOWRY, PHILIP;
BENCHIKH, ELOUARD;
MCCONNELL, IVAN y
FITZGERALD, PETER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 523 896 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 con zolpidem con ventana de detección extendida

Antecedentes de la invención

El zolpidem, de nombre sistemático N,N-dimetil-2-[6-metil-2-(4-metilfenil)imidazo[1,2-a]piridina-3-il]acetamida, es un fármaco prescrito con frecuencia para combatir los trastornos neurológicos y del sueño, especialmente el insomnio. El fármaco está clasificado como un hipnótico no benzodiazepínico, y actúa sobre los receptores del ácido aminobutírico gabba. Tras su ingestión, el zolpidem actúa rápidamente y tiene una vida media de 1,5 a 3 h. El metabolismo se lleva a cabo gracias al citocromo P450, produciendo más del 80 % del ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo-[1,2-a]piridina-2-il] benzoico (M1), formado a través del correspondiente metabolito hidroxilado y una cantidad relativamente pequeña de ácido 3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-2-[4-metilfenil]imidazo[1,2-a]piridin-6-il carboxílico (1-4). A pesar de su eficacia terapéutica demostrada han aumentado las denuncias por problemas de dependencia y abuso para fines delictivos y estimulantes (5-7) y de los efectos secundarios que amenazan la vida debido por las alucinaciones que provoca y porque afecta a la conducción (8). Villain et al (9) informó de que el zolpidem ocupaba el primer lugar en una lista de fármacos utilizados en agresiones sexuales facilitadas por fármacos. Este potencial de abusos o sucesos adversos en individuos que lo toman o que tienen acceso a zolpidem crea una necesidad de que se lleve a cabo una toxicología clínica y forense para su detección y/o determinación, utilizando métodos analíticos prácticos y asequibles. Los métodos analíticos que se han utilizado para detectar e identificar el zolpidem incluyen HPLC, LC-MS-MS, GC y GC-MS. Un método de HPLC con columnas de conmutación, complejo, que emplea un gran equipo técnico y que incorpora una fase de limpieza y de preconcentración con M1 como marcador de sobredosis, ya que es el marcador de zolpidem más abundante en plasma y orina (1). Se describe un método GC-MS que implica la extracción de la muestra y una derivatización del compuesto para detectar el M1 en un plazo máximo de 72 horas en dos casos de presunta agresión facilitada por fármacos con zolpidem (10). El inmunoensayo más económico y más práctico también se ha empleado para detectar y cuantificar el zolpidem. El inmunoensayo presenta muchas ventajas respecto a otros formatos analíticos habituales, como la GC-MS y la LC-MS en cuanto a costes, facilidad de uso y su flexibilidad para fabricarse en un formato portátil y compacto para su uso en el terreno. Se han descrito un radioinmunoensayo (RIA) y un ensayo de tipo EMIT. El RIA describe un inmunógeno en el que el agente de reticulación de proteínas se incorpora en la posición 3 del heterociclo condensado, detectándose así el zolpidem, sin que se haya informado de ningún tipo de reactividad cruzada con los metabolitos (11). El RIA es extremadamente sensible, pero lleva asociados factores de salud y seguridad. Por lo general, los RIA tienen poca aceptación comercial y los inventores desconocen que exista un RIA para zolpidem. Existe un kit disponible en el mercado para la detección forense de zolpidem en sangre entera, suero y orina, con un valor umbral de detección de 25 ng/ml (prospecto de inmunoanálisis ELISA de zolpidem, catálogo 233). Se ha informado de que el kit no detecta M1 a 1000 ng/ml (8). En un inmunoensayo de seguimiento desarrollado por la misma compañía para la detección de zolpidem en la orina se observa un límite de detección de 5 ng/ml y una ventana de detección de ocho horas en una persona descrita como consumidora no frecuente; transcurridas 16 horas, el zolpidem no se pudo detectar (12). Un kit ELISA comercial fabricado por International Diagnostic Systems detecta zolpidem a 75 ng/ml. Ninguno de los kits notificó la detección de M1.

Lamont (13) describió un anticuerpo y un inmunoensayo sensible a zolpidem que no poseía reactividad cruzada con M1.

Debido a que el metabolismo del zolpidem es rápido y varía entre distintas personas (8, 9,12), los presentes inmunoensayos detectan únicamente la molécula original no tienen la sensibilidad suficiente para poder utilizarse de forma fiable como herramienta para detectar el uso indebido de zolpidem o de estar conduciendo bajo sus efectos en muestras de pacientes que se recogieron aproximadamente más allá de 8-24 horas. Para resolver esta incompatibilidad, los inventores idearon y diseñaron un inmunoensayo basado en la detección del zolpidem y su metabolito principal M1. La presente invención permite la detección y determinación inmunosensible del zolpidem y de su metabolito principal en muestras de pacientes y extiende el periodo de tiempo de detección del zolpidem en el que puede ser detectado tras su ingestión.

Bibliografía

1. Ascalone V. et al. (1992); J. Chromatogr. 581: 237-250
2. Hempel G. y Blaschke G. (1996). J. Chromatogr, B 675:131-137
3. von Moltke L. et al. (1999). Br. J. Clin. Pharmacol. 48: 89-97
4. Salva P. y Costa J. (1995). Clin Pharmacokin. 29:142-153
5. Madea B. y Muñozhoff F. (2009). Dtsch. Autebl. Int. 106:341-347
6. Marvelias C et al. (2009). Am. J. Forensic Med. Pathol 30: 384-385
7. Victorri-Vigneau C. et al. (2007). Br. J. Clin. Pharmacol. 64:198-209

8. Reidy L. et al (2008). J. Anal. Tox. 32: 688-694
9. Villain M. et al. (2004). Forensic Sci, Int. 143:157-161
10. Lewis J. y Vin J. (2007). J. Anal. Tox. 31:195-199
11. DeClerck I. y Daenens P. (1997). The Analyst 122:1119-1124
- 5 12. Huynh K. et al. SOFT 2009, October 19-23 2009, Oklahoma, Program and Abstracts
13. Lamont J.V. (2009), Animal meeting of the AACC Clinical Chemistry, vol. 55, nº 6, Suppl. S, página A250.

Compendio de la invención

No existe ningún inmunoensayo para la detección y determinación de zolpidem en muestras in vitro de pacientes que tenga una ventana de detección extendida. La presente invención proporciona una disolución a este problema. La invención emplea un anticuerpo único y de gran sensibilidad que se une al zolpidem y a su metabolito principal, el ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico. La identificación del ácido 4-(3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico por el anticuerpo de gran sensibilidad de la invención permite métodos y kits para detectar e identificar el zolpidem que poseen una ventana de detección más amplia en comparación con otros inmunoensayos. Estos métodos y kits pueden utilizarse, por ejemplo, en casos de detección toxicológica y de violación facilitada por fármacos.

Dibujos

Figura 1 Síntesis de hapteno I

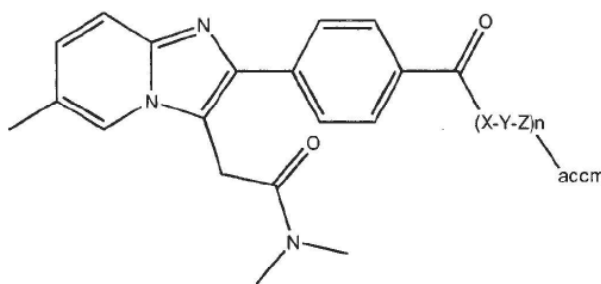
Figura 2 Síntesis de hapteno II

Figura 3 Curvas de concentración-respuesta de anticuerpos para el zolpidem, su metabolito principal y analitos relacionados estructuralmente.

Exposición detallada de la invención

Un primer aspecto de la invención es un inmunógeno de la estructura

Estructura I



Estructura I

Donde -X-Y-Z es un agente de reticulación, $n=0$ ó 1 y accm es un material portador que confiere antigenicidad. En caso de estar presente, el agente de reticulación une el grupo carbonilo del anillo fenilo al accm. X es un heteroátomo, preferiblemente nitrógeno, oxígeno o azufre; Y es un resto arileno o un resto alquileo de C_1 - C_{10} , más preferiblemente de C_2 - C_6 , de cadena lineal, sustituido o sin sustituir; Z (antes de la conjugación con el accm) se selecciona a partir de un resto carboxi, un ditiopiridilo, una maleimida, un amino, un hidroxilo, un tiol, un tioéster o un aldehído, más preferiblemente un resto carboxi. El inmunógeno preferido de la invención es cuando $n=0$. El accm puede ser cualquier material que haga que todo o parte del hapteno sea susceptible a la identificación del anticuerpo y la unión. Por ejemplo, el accm puede ser una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. El anticuerpo puede ser un anticuerpo bmonoclonal, pero es preferiblemente un anticuerpo policlonal.

Un segundo aspecto de la invención es un anticuerpo frente a un inmunógeno de estructura I, que es capaz de unirse a un epítipo de zolpidem y a un epítipo del ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo(1,2-a]piridina-2-il] benzoico. El anticuerpo es preferiblemente específico para zolpidem y presenta una reactividad cruzada para el ácido 4-[3(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)]-6-metilimidazo(1,2-a]piridina-2-il] benzoico. Cuando se

utiliza haciendo referencia a un anticuerpo, la palabra específica en el contexto de la presente invención se refiere al analito que está unido preferentemente por el anticuerpo, según lo medido con parámetros adecuados como la reactividad cruzada, es decir, el analito con la mayor reactividad cruzada es el analito específico del anticuerpo y, en general, se le da un valor de 100 %, asignando a todos los demás analitos un valor con relación a este; además, como bien conoce un experto en la técnica, para que la reactividad cruzada sea práctica, el anticuerpo específico del analito debe presentar una gran sensibilidad, tal como se estima según los parámetros adecuados como el IC₅₀. Para la invención, una gran sensibilidad es un IC₅₀ de menor que 50 ng/ml, preferiblemente menor que 10 ng/ml y aún más preferiblemente menor que 1 ng/ml.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo específico al zolpidem, con una reactividad cruzada con el ácido 4-[3-(2N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina-2-il] benzoico que es mayor que 5 %, preferiblemente mayor que 10 % y aún más preferiblemente mayor que 15 %. El anticuerpo puede ser tanto policlinal como monoclonal (el anticuerpo monoclonal se deriva del policlinal utilizando métodos conocidos); si el anticuerpo monoclonal posee la especificidad y sensibilidad requeridas y se produce en cantidades adecuadas, no será necesario desarrollar un anticuerpo monoclonal. El zolpidem se metaboliza rápidamente, así que es posible que el análisis de una muestra tomada de un paciente, por ejemplo, 48 horas después de la ingestión de una dosis estándar de zolpidem (10 mg), contenga poca o ninguna cantidad de zolpidem y será ácido 4-[3-(2 N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico, que es predominantemente o únicamente detectado o medido con el método y los kits de la invención. Alternativamente, en el análisis de una muestra de un paciente con el método y los kits de la presente invención dentro de las 24 horas de la ingestión de una dosis estándar de zolpidem es posible detectar y determinar el zolpidem y el ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina-2-il] benzoico.

Otro aspecto de la invención es un método para detectar o identificar el zolpidem o el ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico en una disolución o en una muestra in vitro tomada de un paciente; comprendiendo el método en poner en contacto la disolución, o una muestra in vitro, con un conjugado y un anticuerpo que se une a un epítipo del zolpidem y un epítipo del ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico, midiendo un conjugado y deduciendo con un calibrador la presencia o cantidad de zolpidem y de ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico. El anticuerpo es preferiblemente específico para zolpidem y presenta una reactividad cruzada con el ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico. La reactividad cruzada del anticuerpo del ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico es mayor que 5 %, preferiblemente mayor que 10 % y aún más preferiblemente mayor que 15 %. Por «detección» entendemos el análisis cualitativo de la presencia o ausencia de una sustancia. Por «determinación» entendemos el análisis cuantitativo de la cantidad de una sustancia.

Otro aspecto de la invención es un kit de detección o determinación de zolpidem o del ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico; incluyendo el kit un anticuerpo derivado de un inmunógeno de estructura I, y que se une a un epítipo del zolpidem y a un epítipo del ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina-2-il] benzoico. El anticuerpo es preferiblemente específico para zolpidem y presenta una reactividad cruzada con el ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico. La reactividad cruzada del anticuerpo al ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina-2-il] benzoico es mayor que 5 %, preferiblemente mayor que 10 % y aún más preferiblemente mayor que 15 %. El kit también puede incluir de forma opcional un conjugado o un calibrador o calibradores, así como unas instrucciones de uso de los componentes del kit para detectar o determinar el zolpidem o el ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina-2-il] benzoico.

A efectos de la presente invención, la muestra del paciente utilizada en el análisis in vitro podrá ser pelo o un fluido biológico periférico, pero es preferible que sea suero, plasma u orina; la disolución podría ser, por ejemplo, una disolución de células cultivadas. Una disolución de células cultivadas de forma específica para este propósito permitiría que el ensayo in vitro pudiera estudiar, por ejemplo, la actividad del fármaco.

Los conjugados del método se componen de haptenos fijados a agentes de marcaje. Los haptenos de los conjugados son moléculas que pueden unirse a los anticuerpos del método. El uso de haptenos, conjugados y anticuerpos en el contexto de los inmunoensayos es muy conocido en la técnica. El agente de marcaje de los conjugados se selecciona a partir de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva o una mezcla de estas. Es preferible que el agente de marcaje sea una enzima, concretamente una peroxidasa, lo más preferiblemente una peroxidasa del rábano (HRP, por sus siglas en inglés). De forma alternativa o adicional, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente.

Métodos y resultados

Preparación de los haptenos, inmunógenos y conjugados

Aunque los haptenos proporcionan epítopos estructurales definidos, no son en sí mismos inmunógenos y, por lo tanto, necesitan ser conjugados con materiales portadores, lo que provocará una respuesta inmunógena cuando se administra a un animal huésped. Los materiales portadores pertinentes contienen por lo general segmentos de

poli(aminoácidos) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteínas. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KI.H), etcétera. Alternativamente, se pueden emplear poli(aminoácidos) sintéticos con un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como la lisina, puesto que otros materiales poliméricos naturales o sintéticos pueden portar grupos funcionales reactivos. Además, los carbohidratos, las levaduras o los polisacáridos pueden conjugarse con el hapteno para producir un inmunógeno. Los haptenos también se pueden acoplar a un agente de marcaje detectable como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano), una sustancia con propiedades fluorescentes o una etiqueta radioactiva para preparar 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 del mismo. La formación de inmunógenos puede llevarse a cabo mediante varias rutas sintéticas. La formación de inmunógenos para la invención descrita en la presente memoria implica una química de conjugación convencional. El primer método empleado implica la reacción del hapteno I con DCC y, posteriormente NHS para formar un éster con un grupo saliente potente. El ataque nucleófilo sobre el carbonilo de la función éster por un grupo amino en la proteína (BSA o BTG) da lugar a un enlace amida y la formación de inmunógenos diana. El segundo método empleado implica la reacción del hapteno II tri-n-butilamina y clorformato de isobutilo (IBCF), seguido de adición de proteína (BSA o BTG). Con el fin de confirmar que se ha conseguido la conjugación adecuada del hapteno con el material portador, antes de la inmunización, se evalúa cada inmunógeno utilizando espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés).

Procedimiento general para el análisis de inmunógenos por MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas de desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Se diluyó una alícuota de cada una de las muestras objeto de análisis en ácido trifluoroacético acuoso al 0,1 % (TFA) para crear disoluciones de muestra de 1 mg/ml. Estas alícuotas (1 µl) se analizaron utilizando una matriz de ácido sináptico y la albúmina de suero bovino (fluka) se usó como un calibrador externo.

Preparación de antisueros

Con el fin de generar antisuero policlonal, un inmunógeno de la presente invención se mezcla con adyuvante de Freund y la mezcla se inyecta en un animal huésped, como un conejo, una oveja, un ratón, una cobaya o un caballo. Es preferible utilizar ovejas como animal huésped. Se elaboran inyecciones adicionales (refuerzos) y se obtiene una muestra del suero para evaluar el título de anticuerpos. Cuando el título óptimo se ha alcanzado, se extrae sangre del animal para producir un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de anticuerpos requerido depende de la aplicación prevista. En muchos casos no se requiere una purificación; sin embargo, en otros casos, como cuando el anticuerpo tiene que ser inmovilizado sobre un soporte sólido, se pueden aplicar etapas de purificación para separar material no deseado y eliminar uniones no específicas.

Desarrollo del inmunoanálisis

El proceso de desarrollar un inmunoensayo es bien conocido por expertos en la técnica. En resumen, para un inmunoensayo competitivo en el que el analito diana es una molécula no inmunogénica tal como un hapteno, se lleva a cabo el siguiente proceso: se producen anticuerpos mediante la inmunización de un animal, preferiblemente un mamífero, al que se le administra de forma repetida un inmunógeno. El suero del animal inmunizado se recoge cuando el título de anticuerpos es suficientemente alto. Se añade un conjugado a una muestra que contiene el analito diana y los anticuerpos generados, y el conjugado y el analito compiten para unirse a los anticuerpos. El proceso puede comprender la fijación de dichos anticuerpos de suero a un sustrato de soporte tal como un soporte sólido de poliestireno o un biochip. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, obteniéndose los anticuerpos monoclonales a partir de suero policlonal mediante técnicas estándar. La señal emitida en el inmunoensayo es proporcional a la cantidad de conjugado unido a los anticuerpos, que a su vez es inversamente proporcional a la concentración de analito. La señal puede detectarse o cuantificarse comparándola con un calibrador.

Ejemplo 1: preparación de 2-(4-tolil)imidazo[1,2-a]piridin-6-carboxilato de metilo

Se añadió 2-bromo-4'-metilacetofenona **2** (14,5 g; 65,1 mmol) a una disolución caliente de 2-aminopiridin-5-carboxilato de metilo **1** (9,0 g; 61,1 mmol) en etanol (280 ml). Después, la disolución se calentó a reflujo durante 6 h; se enfrió a temperatura ambiente y el sólido blanco se filtró y lavó con etanol para obtener 2-(4-tolil)-imidazo[1,2-a]piridin-6-carboxilato de metilo **3** (13,9 g; 80%).

Ejemplo 2: preparación de ácido 2-hidroxi-2-[6-metoxicarbonil-3-(4-tolil)imidazo[1,2-a]piridin-3-il] acético

A una suspensión de 2-(4-tolil)imidazo[1,2-a]piridin-6-carboxilato de metilo **3** (13,31 g; 50 mmol) en diclorometano (100 ml) se añadió ácido glioxílico monohidrato sólido (6 g) y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 h. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el sólido blanco se filtró, se lavó con diclorometano, y se secó *ai vacuo* para obtener (14,9 g; 87 %) de ácido 2-hidroxi-2-[6-metoxicarbonil-3-(4-tolil)imidazo[1,2-a]piridina-3-il] acético **4** como un sólido blanco.

Ejemplo 3: preparación de ácido 2-[6-metoxycarbonil-3-(4-tolil)imidazo[1,2-a]piridin-3-il] acético

A una disolución de **4** (8,5 g; 25 mmol) en ácido fórmico (100 ml) bajo nitrógeno se añadió 10 % de catalizador de paladio/carbono (600 mg) y la mezcla se calentó a reflujo durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se evaporó a sequedad. Se añadió agua (100 ml) y la mezcla se agitó durante 2 h. El precipitado blanco se filtró, se lavó con agua (2x50 ml) y se secó para obtener el sólido marrón claro/amarillo de ácido 2-[6-metoxycarbonil-3-(4-tolil)imidazo[1,2-a]piridin-3-il] acético **5** (7,9 g; 97 %).

Ejemplo 4: preparación de 3-dimetilcarbamoilmetil-2-(p-tolil)imidazo[1,2-a]piridin-6-carboxilato

Hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)N,N,N',N'-tetrametiluronio (7,752 g; 20,48 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (0,92 g; 6,8 mmol) y n,n-etildisopropilamina (4,8 ml; 27,76 mmol) se añadieron a una suspensión de **5** (4,4 g; 13,6 mmol) en diclorometano (200 ml). La disolución se agitó durante 30 min en nitrógeno, se añadió dimetilamina (2M en THF, 9,33 ml; 28,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió diclorometano (200 ml) y la disolución se lavó con HCl (0,5 N), una disolución saturada de NaCl y una disolución de NaHCO₃ al 10 %. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente, obteniendo una crema ligera de 3-dimetilcarbamoilmetil-2-(4-tolil)imidazo[1,2-a]piridin-6-carboxilato de metilo **6** (3,2g; 67%) sólido.

Ejemplo 5: preparación de ácido 3-dimetilcarbamoilmetil-2-(4-tolil)imidazo[1,2-a]piridin-6-carboxílico (hapteno-I)

Se añadió hidróxido de litio 1N (84 ml; 15,4 mmol) gota a gota a una disolución de **6** (3,0 g; 8,53 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (100 ml) y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó y la fase acuosa se lavó con cloroformo, se neutralizó a pH 7 con HCl 1N y se evaporó a sequedad. La mezcla sólida obtenida se suspendió en cloroformo: metanol (9:1) (100 ml) y se agitó durante 1 h. La mezcla sólida se eliminó por filtración, se secó y purificó por cromatografía (cloroformo:metanol, 9:1) para obtener el hapteno I (1,67 g; 58%) NMR ¹³C (CD₃OD) (δ, ppm): 172,48; 171,05; 146,92; 146,09,139,64; 132,69; 130,77; 130,01; 128,91; 127,9; 125,43; 117,55; 115,7; 38,27; 36,64; 30,53 y 21,71. MS: Masa fórmula (338,1503); Masa Calc. (338,1505).

Ejemplo 6: conjugación de hapteno I a BSA (inmunógeno-I)

A una disolución de hapteno I (25,36 mg; 0,076 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (17,06 mg; 0,082 mmol) y N-hidroxisuccinimida (9,52 mg; 0,082 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La diciclohexilurea formada se separó por filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BSA (100 mg; 1,5 μmol) en una disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (5 ml). La mezcla se agitó a 4°C toda la noche. La disolución se dializó a continuación frente a tampón fosfato 50 mM con pH de 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4°C y se liofilizó. Los resultados de MALDI mostraron que 23,66 moléculas de hapteno I se habían conjugado con una molécula de BSA.

Ejemplo 7: conjugación de hapteno I a BTG (inmunógeno-I)

A una disolución de hapteno I (45,7 mg; 0,135 mmol) en DMI (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (30,7 mg, 0,149 mmol) y N-hidroxisuccinimida (17,13 mg; 0,149 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La diciclohexilurea formada se separó por filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BTG (150 mg; 2,25 μmol) en una disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). La mezcla se agitó durante la noche a 4°C. A continuación, la disolución se dializó frente a tampón fosfato 50 mM con pH de 7,2 (3 cambios) durante 24 horas y se liofilizó.

Ejemplo 8: conjugación de hapteno I a HRP

El clorhidrato EDC (10 mg) se disolvió en agua (0,5 ml) y se agregó inmediatamente a una disolución de hapteno I (2 mg) en DMF (0,2 ml). La disolución resultante se añadió gota a gota a una disolución de 20 mg de HRP en 1 ml de agua. Se añadió sulfo-NHS (5 mg) y la mezcla se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el exceso de hapteno con columnas dobles PD-10 (Pharmacia) en serie, equilibrado previamente con PBS (pH 7,2) y el conjugado hapteno-HRP se dializó durante la noche frente a 10L de PBS (pH 7,2) a 4°C.

Ejemplo 9: preparación de α-bromo-4-(metoxycarbonil)acetofenona

Se añadió bromo (7,2 ml; 0,14 mol) gota a gota a una disolución agitada de 4-acetilbenzoato de metilo (25,0 mg; 0,14 mol) en ácido acético (300 ml). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 4 h; después se vertió en agua (1,5 l) y se agitó durante 1 h. La mezcla sólida resultante se filtró y lavó sucesivamente con agua y hexano; después, se secó al vacío durante la noche para obtener α-bromo-4-(metoxycarbonil)acetofenona **8** (32 g; 89 %).

Ejemplo 10: preparación de 4-(6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il)benzoato de metilo

A una disolución caliente de 2-amino-5-metilpiridina **7** (8,42 g; 77,8 mmol) en etanol (500 ml) se añadieron **8** (20,0 g; 77,8 mmol). La disolución se calentó a reflujo durante 18 horas, se enfrió a temperatura ambiente y el sólido blanco se filtró y se lavó con etanol para obtener 4-(6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il)benzoato de metilo **9** (15,9 g; 76,7 %).

Ejemplo 11: preparación de 4-(3-terc-butoxicarbonilmetil-6-metil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)benzoato de metilo.

Se añadió diazoacetato de terc-butilo (5,0 ml; 35,15 mmol) y, después gradualmente polvo de cobre (2,5 g) a una disolución de reflujo de **9** (5 g; 18,8 mmol) en tolueno anhidro (150 ml). Después de 3 h más de reflujo, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y la suspensión se filtró y se secó. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano-acetato de etilo, 1:1) dio 4-(3-terc-butoxicarbonilmetil-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il)benzoato de metilo **10** (3,35 g; 47 %).

Ejemplo 12: ácido [2-(4-carboximetilfenil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-3-il] acético

Se añadió una disolución de **10** (3,1 g; 8,15 mmol) en diclorometano (50 ml) a ácido trifluoroacético (25 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, la disolución se concentró a sequedad. Se añadió una disolución (100 ml) de carbonato potásico (10 %) y la disolución se lavó con éter dietílico (2x50 ml) y se acidificó a pH 6 con HCl (6N). El precipitado se filtró, se lavó con éter dietílico y se recristalizó para obtener [2-(4-carboximetilfenil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina-3-il]ácido acético **11** como un sólido blanco (1,65 g; 62 %).

Ejemplo 13: preparación de 4-(3-N,N-dimetilcarbamoilmetil-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il)benzoato de metilo

El 4-(3-N,N-dimetilcarbamoilmetil-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il)benzoato de metilo se preparó a partir del ácido carboxílico **11** (1,5 g; 4,6 mmol), hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (2,61 g; 6,86 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (312,0 mg; 2,26 mmol), N,N-etildisopropilamina (1,2 g; 9,2 mmol) y dimetilamina (2M en THF; 1,55 ml; 4,64 mmol) de una manera similar a la descrita para la síntesis de **6** (Ejemplo 4). Se obtuvieron 1,33 g de 4-(3-N,N-dimetilcarbamoilmetil-6-metilimidazo[1,2-a]piridina-2-il)benzoato de metilo **12** (82 %).

Ejemplo 14: preparación de ácido 4-(3-N,N-dimetilcarbamoilmetil-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il) benzoico (hapteno-II)

Se añadió gota a gota hidróxido de litio 1N (33,6 ml; 6,16 mmol) a **12** (1,2 g; 3,41 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (30 ml) y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se retiró y la fase acuosa se lavó con cloroformo, se neutralizó a pH 7 con HCl 1N y se secó. El sólido obtenido se suspendió en una mezcla de cloroformo y metanol 9:1 (100 ml) y se agitó durante 1 h. El sólido se filtró, se secó y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (cloroformo-metanol, 9:1) para obtener el hapteno II (0,85 g; 74 %).

MS: Masa fórmula (338,1505); Masa calc. (338,1523).

Ejemplo 15: conjugación de hapteno II con BSA (inmunógeno-III)

Se añadieron tri-n-butilamina (31,42 µl; 0,066 mmol) y cloroformiato de isobutilo (IBCF) (17,02 µl; 0,132 mmol) a una disolución a 0°C de hapteno II (40,48 mg; 0,06 mmol) en DMF (3 ml) en nitrógeno. Después de 15 minutos la mezcla se añadió gota a gota a una disolución enfriada de BSA (100 mg) en de bicarbonato de sodio 100 mM, pH 8,5 (10 ml) que se agitó a 4°C durante la noche. A continuación, la mezcla se dializó utilizando un tampón fosfato 50 mM con pH de 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4°C y se liofilizó. Los resultados de MALDI mostraron que 29,1 moléculas de hapteno-II se habían conjugado con una molécula de BSA.

Ejemplo 16: conjugación de hapteno-II a BTG (inmunógeno-IV)

Se añadieron tri-n-butilamina (53,1 µl; 0,223 mmol) y cloroformiato de isobutilo (IBCF) (28,7 µl; 0,223 mmol) a una disolución a 0°C de hapteno-II (68,5mg; 0,203mmol) en DMF (3 ml) en nitrógeno. Después de 15 minutos la mezcla se añadió gota a gota a una disolución enfriada de BTG (150 mg) en de bicarbonato de sodio 100 mM, pH 8,5 (10 ml) que se agitó a 4°C durante la noche. A continuación, la mezcla se dializó utilizando un tampón fosfato 50 mM con pH de 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4°C y se liofilizó.

Ejemplo 17: conjugación de hapteno-II de la HRP

Tri-n-butilamina (38 µl) y cloroformiato de isobutilo (IBCF) (2 pl) se añadieron a una disolución a 0°C de hapteno-II (2 mg) en DMF (200 µl) en nitrógeno. La mezcla se agitó durante 10 minutos, se añadió gota a gota a una disolución enfriada de HRP (200 mg) en agua (800 µl) y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el exceso de hapteno con columnas dobles PD-10 (Pharmacia) en serie, equilibrado previamente con PBS (tampón fosfato salino) con pH 7,2. El conjugado hapteno-HRP se dializó durante la noche frente a 10L de PBS a pH 7,2 a 4°C.

Ejemplo 18: desarrollo de ELISA para zolpidem

Los análogos del zolpidem derivatizados en el anillo 4'-fenilo se acoplaron mediante un agente de reticulación a la tiroglobulina bovina (BTG). Los inmunógenos resultantes se administraron a ovejas adultas separadamente y mensualmente para obtener antisuero policlonal específico-diana. Se extrajo IgG a partir del antisuero mediante una precipitación de sulfato de amonio/ácido caprílico de inmunoglobulina. Las placas de microtitulación se recubrieron con el anticuerpo (125 µl/pocillo) en un tampón de recubrimiento (10 mM Tris pH 8,5) a 37°C durante 2 horas. Las placas se lavaron 4 veces durante 10 minutos con fuerza de trabajo TBST. Se añadieron 50 µl de muestra/ estándar (zolpidem, Sequioa SRP00500z, alpidem, TRC A575560; zaleplon, Sequioa SRP00300z; zopícrona, Sequioa SRP02000z; ácido carboxílico zolpidem, Randox LK865 y ácido carboxílico zolpidem, Randox LK855) a los pocillos

apropiados por triplicado, seguido de 75 µl de hapteno conjugado con HRP y se incubó a 25°C durante 1 h. A continuación se lavaron las placas y se añadieron 125 µl de TMB (Randox, 4380-15) a cada pocillo y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo con 125 µl de ácido sulfúrico 0,2 M. La absorbancia se leyó a 450 nm con un lector de microplacas ELISA (BIO-TEK Instruments, Elx800) y se calcularon las medias. Entonces se determinaron la especificidad y sensibilidad del anticuerpo.

Resultados

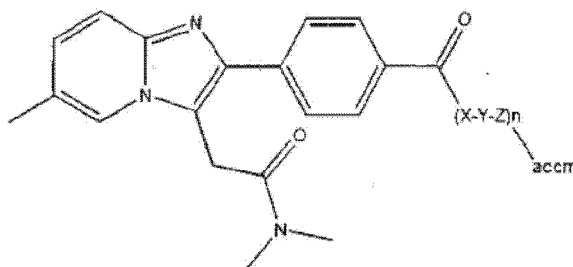
Los resultados ELISA competitivos de la tabla 1 y la figura 3 ponen de manifiesto la especificidad del anticuerpo de la invención hacia el zolpidem y la reactividad cruzada hacia el ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina-2-il] benzoico. Los anticuerpos no muestran reacción cruzada con varios fármacos comunes relacionados estructuralmente. La invención, mediante sus inmunógenos y anticuerpos únicos, permite, por lo tanto, contar con métodos y kits capaces de detectar y determinar el zolpidem o ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2il] benzoico con gran sensibilidad.

Tabla 1

	Zolpidem	MI	M2	Alpidem	Zaleplon	Zolpidem
IC ₅₀	0,63	3,33	>500	»50	»50	»50
%CR	100	18,6	<0,13	«1,26	«1,26	«1,26
IC ₅₀ - concentración estándar que produce el 50% B/B ₀ , %CR= porcentaje de reactividad cruzada basado en el 100% de especificidad para el zolpidem. B= absorbancia de 450nm con una concentración estándar de x ng/ ml.						
B ₀ = absorbancia de 450 nm a una concentración estándar de 0 ng/ml:						

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno de la estructura



en donde

- 5 accm es un material transportador que confiere antigenicidad; n= 0 ó 1; X es un heteroátomo, preferiblemente nitrógeno, oxígeno o azufre; Y es un resto arileno o alquileo de cadena lineal, sustituido o sin sustituir, de C₁₋₁₀, preferiblemente de C₂₋₆; Z es, antes de la conjugación con el accm, carboxi, ditiopiridilo, maleimida, amino, hidroxilo, tiol, tioéster o un resto aldehído.
- 10 2. Un anticuerpo generado contra un inmunógeno de la reivindicación 1 que es específico para un epítipo de zolpidem y que presenta reactividad cruzada a un epítipo de ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il] benzoico.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2 cuya reactividad cruzada con el ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il]benzoico es mayor que 5 %, preferiblemente mayor que 10 % y aún más preferiblemente mayor que 15%.
- 15 4. Un método de detección o identificación del zolpidem o del ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino 2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il]benzoico en una disolución de una muestra in vitro tomada de un paciente; comprendiendo el método en poner en contacto la muestra con el anticuerpo de las reivindicaciones 2 o 3 con un conjugado, midiendo el conjugado y deduciendo a partir de un calibrador la presencia o cantidad de zolpidem o del ácido 4-[3-(2-N,N-dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il]benzoico.
- 20 5. Un kit para detectar o identificar el zolpidem o el ácido 4-[3-(2-N,N dimetilamino-2-oxoetil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridin-2-il]benzoico que comprende un anticuerpo de las reivindicaciones 2 o 3.
6. El kit de la reivindicación 5 que también comprende un conjugado y/o un calibrador.
7. El anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, que es un anticuerpo policlonal.

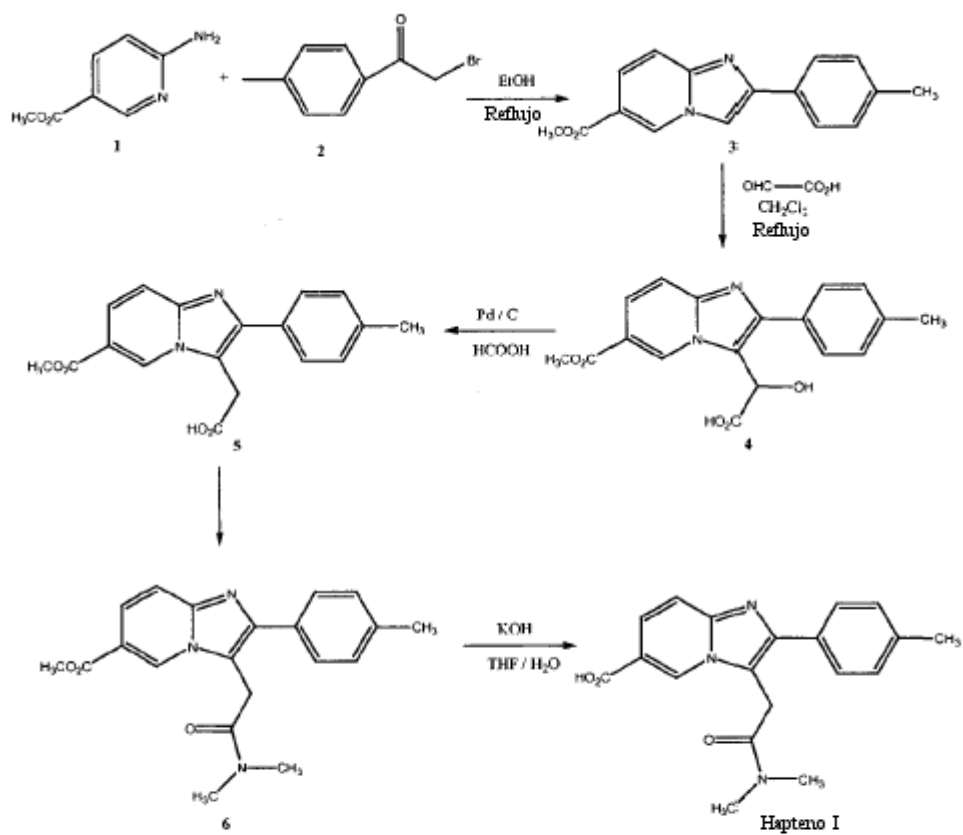


Figura 1 Síntesis de Hapteno I

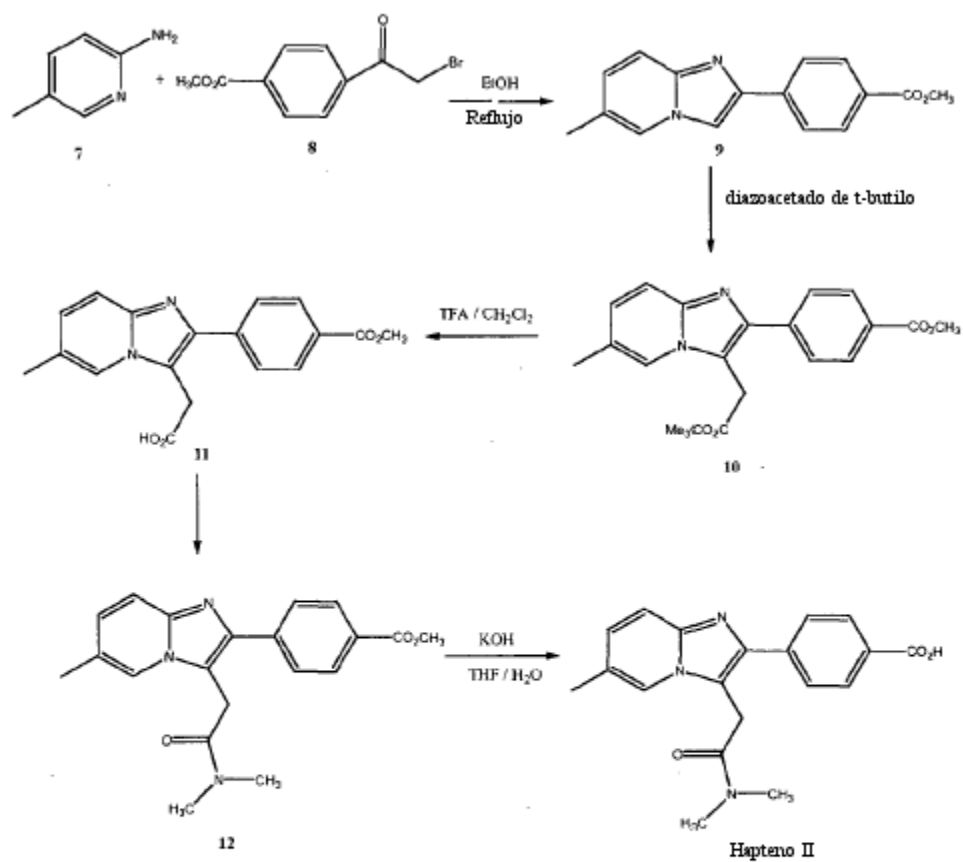


Figura 2 Síntesis de Hapteno II

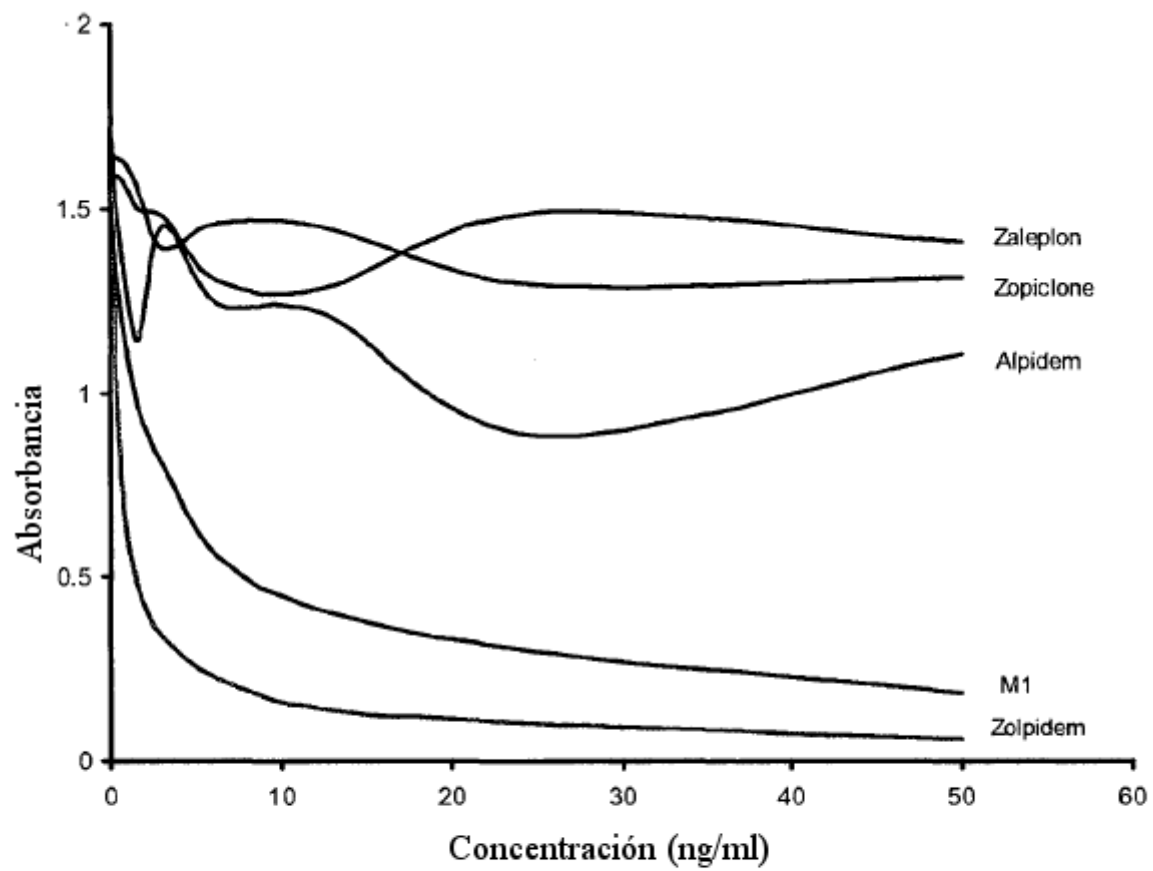


Figura 3 Curvas de relación concentración-respuesta de anticuerpos