



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 737**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

C07C 229/14 (2006.01)

C07C 327/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03075218 .2**

96 Fecha de presentación : **23.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1333023**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2003**

54

Título: **Inmunógenos, anticuerpos y conjugados para cetamina y sus metabolitos.**

30

Prioridad: **31.01.2002 EP 02075445**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.05.2011

73

Titular/es: **RANDOX LABORATORIES Ltd.**
Ardmore, Diamond Road
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB

72

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

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Inmunógenos, anticuerpos y conjugados para cetamina y sus metabolitos

5 La presente invención se relaciona con inmunógenos, anticuerpos y conjugados, para uso en inmunoensayos competitivos para la detección de cetamina [(±)-2-(o-clorofenil)-2-(metilamino) ciclohexanona] y su metabolito primario, norcetamina.

10 La presente invención también se relaciona con un método y un kit para detectar y determinar cetamina y norcetamina.

Por "detectar" se entiende analizar cuantitativamente la presencia o la ausencia de una sustancia.

15 Por "determinar" se entiende analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia.

La cetamina (ver la Figura 1 de los dibujos acompañantes) es un agente anestésico parenteral de corta duración que ha estado en uso clínico durante 30 años. El medicamento causa una analgesia profunda con dosis subanestésicas y carece de los efectos de depresión cardiorrespiratoria asociados con la mayoría de los otros anestésicos generales. A pesar de estas importantes ventajas clínicas, sin embargo, reacciones perturbadoras de emergencia, incluido delirio y sueño no placentero, frecuentemente acompañan la terapia con cetamina y limitan su utilidad clínica. Aunque el origen de estos efectos secundarios adversos del sistema nervioso central (CNS) permanecen sin dilucidar, se ha especulado que los metabolitos de la cetamina pueden jugar un papel importante ya que las concentraciones que circulan del medicamento original son muy bajas durante una emergencia de anestesia inducida por cetamina. La cetamina experimenta un gran metabolismo por parte de las enzimas hepáticas, produciendo principalmente, por N-desmetilación, norcetamina (ver la Figura 1 de los dibujos acompañantes). Esta amina primaria es metabolizada adicionalmente por hidroxilación del sistema anular del ciclohexano en las posiciones 4, 5 y/o 6 para producir una familia de norcetaminas hidroxiladas, cuyo miembro predominante es 6-hidroxinorcetamina (ver la Figura 1 de los dibujos acompañantes).

30 Estado del arte

Hasta el día de hoy, la determinación de cetamina y sus metabolitos en fluidos biológicos se ha basado principalmente en espectrometría de masas - cromatografía de gases (GC - MS) y HPLC. Estos métodos cromatográficos proveen una excelente sensibilidad y selectividad pero requieren de la derivatización de la cetamina y sus metabolitos. Estos métodos son, además, muy costosos y consumen mucho tiempo para ser utilizados como herramientas de evaluación.

Se han utilizado extensamente reacciones específicas de enlazamiento, tales como interacciones anticuerpo-antígeno, en inmunoensayos para detectar una variedad de sustancias presentes en fluidos biológicos.

40 Así, por ejemplo, podrían utilizarse radioinmunoensayos para la determinación de cetamina y sus metabolitos. Los radioinmunoensayos son muy sensibles, pero requieren de trazadores radionúclidos, por ejemplo ^{125}I y ^3H , y en algunos casos, una etapa preliminar de extracción. No se conocen RIA para la cetamina.

45 Los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (los ELISA) son una alternativa no radioactiva que podría ser utilizada para la determinación cualitativa y cuantitativa de cetamina y sus metabolitos. Nuevamente, no se conocían los ELISA para cetamina cuando la Solicitud de Patente Europea No. 02075445.3 que constituye prioridad fue presentada el 31 de enero de 2002. Desde entonces, Neogen Corporation lanzó un kit de ELISA para cetamina con una reactividad cruzada del 100% con cetamina y una reactividad cruzada del 4,6% con norcetamina. Se cree que el kit de Neogen utiliza anticuerpos y conjugados desarrollados contra un hapteno de cetamina que incorpora al menos al epítipo metilamino de cetamina.

EP 0 459 387 A2 (Abbott Laboratories) describe un ensayo de polarización de fluorescencia para fenciclidina y ciertos derivados de fenciclidina. Los derivados de fenilciclohexilamina se conjugan con materiales portadores para

producir inmunógenos y con derivados de fluoresceína para producir trazadores. Se generan anticuerpos, preferiblemente monoclonales, con los inmunógenos. Se desarrolla un inmunoensayo para fenciclidina y derivados de fenciclidina empleando los trazadores y anticuerpos anteriormente mencionados. Este inmunoensayo exhibe un alto grado de especificidad con fenciclidina, metabolitos de fenciclidina y análogos de fenciclidina. No reacciona significativamente en forma cruzada con cetamina (ver la Tabla 3(c) en la página 18). Aunque los derivados de fenilciclohexilamina exhiben similitud estructural con los haptenos de la presente invención, la ausencia de un grupo cloro sobre el anillo de fenilo y de un grupo carbonilo sobre el anillo de ciclohexilo son ambos significativos, como se corrobora por la carencia de reactividad cruzada del inmunoensayo de Abbott con cetamina.

Owens et al: ('Antibodies against arylcyclohexylamines y their similarities in binding specificity with the fenciclidina receptor' (J. Pharmacol. Exp. Ther. (1988), 246(2), 472 - 478)) describe anticuerpos contra cinco epítopos de moléculas del tipo fenciclidina (PCP), para determinar los requerimientos moleculares del enlazamiento de arilciclohexilamina con el receptor de PCP. Se sintetizan cuatro haptenos a partir de derivados de PCP y el análogo de TCP, es decir PCHP; PCHBA; tPPC y TCHP. El quinto hapteno se elabora a partir de fenilciclohexilamina: PCHAP. Estos haptenos se conjugan con BSA para producir inmunógenos que son utilizados para generar anticuerpos de reactividad cruzada. Los anticuerpos producidos son altamente específicos para PCP y algunos compuestos relacionados pero exhiben reactividad cruzada muy baja con cetamina (<0.6%) (Tabla 2, página 475). El hapteno PCHAP se diferencia de los haptenos de la presente invención en que no existe un grupo cloro sobre el anillo de fenilo y no existe un grupo carbonilo sobre el anillo de ciclohexilo. La ausencia de estas dos unidades estructurales es, nuevamente, significativa, como lo demuestra la carencia de reactividad cruzada con cetamina.

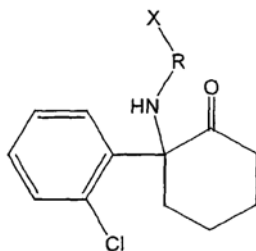
Owens et al: ('Molecular requirements for an immunological model of the fenciclidina receptor' Sigma y PCP-Like Compounds as Molecular Probes in Biology, 1988) describe la preparación de haptenos, inmunógenos y anticuerpos con PCP y otras arilciclohexilaminas (Tabla 1, página 667). Se preparan cuatro haptenos: PCHP; tPPC; PCHBA y PCHAP (ver la Fig. 1, página 665). Los anticuerpos generados exhibieron niveles altos de reactividad cruzada con PCP y con compuestos relacionados y niveles bajos de reactividad cruzada con cetamina, como se indica por medio de los altos valores de IC₅₀ (Tabla 1, página 667). Una vez más, la ausencia de los grupos cloro y carbonilo es, de nuevo, significativa, como lo demuestra la carencia de reactividad cruzada con cetamina.

Leung et al: ('Comparative pharmacology in the rat of ketamine y its two principal metabolites, norketamine y (z)-6-hydroxynorketamine' J. Med. Chem. (1986), 29(11), 2396-2399) describe la síntesis de (z)-6-hidroxinorketamina (un metabolito secundario de cetamina) a partir de norcetamina, el metabolito primario de cetamina. Ellos también llevan a cabo estudios farmacológicos comparativos en ratas sobre la cetamina, norcetamina y (z)-6-hidroxinorketamina. Leung et al no describen ni sugieren cómo elaborar haptenos, inmunógenos y anticuerpos con cetamina o norcetamina.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un hapteno derivatizado con un agente de entrecruzamiento en la posición N de la norcetamina.

Preferiblemente, el hapteno tiene la siguiente fórmula estructural:



en la cual R es un enlace bivalente y X es un grupo terminal.

Más preferiblemente, R incluye una unidad estructural de alquileo de cadena recta o ramificada, sustituida o no sustituida, saturada o insaturada; y X incluye un ácido carboxílico o un éster del mismo; una amina, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster del mismo, un aldehído, una unidad estructural de ditiopiridilo, una unidad estructural de vinilsulfona o un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo.

En consecuencia, en la fórmula de la modalidad preferida, el agente de entrecruzamiento contiene -R-X. El agente de entrecruzamiento, en el aspecto más amplio de la invención, puede contener también -R-X.

Más preferiblemente, R es una unidad estructural de alquileo C₁₋₅, más preferiblemente C₃, saturada, de cadena recta, sustituida o no sustituida.

Más preferiblemente, el sustituyente, si está presente, es un grupo carbonilo.

Convenientemente, X se selecciona de una unidad estructural de ácido carboxílico, de un ácido tiocarboxílico, de un ditiopiridilo, de una maleimida, o de un aldehído. Lo más conveniente, X es una unidad estructural carboxi (COOH) o tioacetilo (SCOCH₃).

Lo más conveniente, el hapteno se selecciona de los siguientes derivados de hapteno de la norcetamina: N-(4'-carboxipropil)norcetamina (hapteno A); N-(3'-acetiltiopropil)norcetamina (hapteno B); y N-(3'-acetiltiopropionamido) norcetamina (hapteno C)

Estos haptenos se preparan por medio de N-derivados, preferiblemente N-alquilación, de norcetamina utilizando los agentes de entrecruzamiento apropiados.

Los haptenos resultantes pueden ser luego modificados adicionalmente en estas posiciones que portan una función para conjugación con materiales portadores modificados o no modificados para proveer inmunógenos para producción de anticuerpos y conjugados (trazadores) que tengan excelente sensibilidad y especificidad para la detección o determinación de cetamina y norcetamina.

La presente invención divulga la preparación de derivados de hapteno de la norcetamina. Estos haptenos se emplean en la preparación de inmunógenos acoplándolos con materiales portadores que confieren antigenicidad modificada o no modificada. Los inmunógenos obtenidos son luego administrados a huéspedes mamíferos para obtener la producción de anticuerpos específicos, preferiblemente anticuerpos policlonales, que son utilizados luego para desarrollar inmunoensayos competitivos para cetamina y norcetamina, empleando haptenos conjugados con agentes rotuladores como reactivos de detección.

La invención proporciona un inmunógeno que contiene un hapteno como se describe en la presente invención, acoplado con un material portador que confiere antigenicidad. Preferiblemente, el material portador es una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético.

En aún un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con anticuerpos surgidos contra el inmunógeno de la presente invención, siendo capaz el anticuerpo de enlazarse con al menos un epítipo estructural de norcetamina o cetamina. Preferiblemente, el epítipo estructural es la unidad estructural arilciclohexanona, más preferiblemente la unidad estructural clorofenilciclohexanona, lo más preferible la unidad estructural o-clorofenilciclohexanona, de cetamina y norcetamina.

En aún otro aspecto, la presente invención se relaciona con anticuerpos que tienen especificidad por cetamina caracterizados por tener reactividad cruzada de más del 100%, preferiblemente 100 - 175%, por norcetamina.

En aún un aspecto adicional, la presente invención comprende un conjugado que contiene al hapteno de la presente invención enlazado en forma covalente con un agente marcador detectable. Preferiblemente, el agente de marcación se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva, o una mezcla de los mismos.

Más preferiblemente, el agente marcador es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, lo más preferible peroxidasa de rábano (HRP). Alternativamente, o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente.

- 5 La invención describe un proceso para preparar los anticuerpos, donde el proceso comprende las etapas de inmunizar un animal, preferiblemente un animal vertebrado, lo más preferible un animal mamífero, por medio de la administración repetida de un inmunógeno de acuerdo con la presente invención, y recolectar el suero resultante del animal inmunizado. Preferiblemente, el proceso comprende además la fijación de dichos anticuerpos del suero a un sustrato de respaldo, preferiblemente un soporte sólido, lo más preferible un soporte sólido de poliestireno.
- 10 Preferiblemente, los anticuerpos son policlonales. Alternativamente, los anticuerpos son monoclonales.

- En aún un aspecto adicional, la presente invención comprende un método *in vitro* para detectar o determinar cetamina y norcetamina en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con el conjugado de la presente invención, o una mezcla de los mismos, y con anticuerpos de la presente invención, o una mezcla de
- 15 los mismos; detectar o determinar el conjugado enlazado; y deducir a partir de una curva de calibración la presencia de, o la cantidad de, cetamina y norcetamina en la muestra.

- En un aspecto adicional, la invención incluye un kit para detectar o determinar cetamina y norcetamina, incluyendo el kit al conjugado de la presente invención, o una mezcla del mismo; y los anticuerpos de la presente invención, o una
- 20 mezcla de los mismos. El kit pueden incluir opcionalmente las instrucciones de uso de dichos conjugados y dichos anticuerpos para detectar o determinar cetamina y norcetamina en una muestra.

- Preferiblemente, la muestra es una solución, tal como un fluido biológico. Más preferiblemente, la muestra es suero u orina.
- 25

- En el método y el kit de la presente invención, se prefiere que los agentes de entrecruzamiento respectivos (del inmunógeno y el conjugado) sean diferentes.

- En un aspecto adicional, la presente invención involucra el uso *in vitro* de los conjugados de acuerdo con la presente invención, o una mezcla de los mismos, con los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, o una mezcla de los mismos, para detectar o determinar cetamina y norcetamina en muestras tales como fluidos biológicos.
- 30

Preparación de Haptenos

- 35 Los haptenos de la N-(4'-carboxipropil)norcetamina **A**, N-(3'-acetiltiopropil)norcetamina **B** y N-(3'-acetiltiopropionamido) norcetamina **C** se preparan de acuerdo con la Figura 2 de los dibujos acompañantes. La bromación de (o-clorofenil)ciclopentilcetona **1** con bromo en tetracloruro de carbono produce a-bromo-(o-clorofenil)ciclopentilcetona **2**. Se trata la bromocetona **2** con amoníaco líquido para producir 1-[(o-clorofenil)iminometil]ciclopentanol **3**. Se obtiene la norcetamina **4** después de reordenamiento térmico de la imina de alcohol **3** a 200°C. La N-alkilación de norcetamina **4** por medio de semialdehído succínico en presencia de cianoborhidruro de sodio produce la N-(4'-carboxipropil)norcetamina (Hapteno **A**). La reacción de norcetamina **4** con iodopropiltioacetato en solución alcalina etanólica produce N-(3'-acetiltiopropil) norcetamina (Hapteno **B**). Se obtiene la N-(3'-acetiltiopropionamido)norcetamina (Hapteno **C**) por reacción de norcetamina **4** con ácido 3-acetiltiopropiónico en DMF en presencia de clorhidrato de EDC y piridina.
- 40

- 45 El hapteno de la 6-O-(3'-acetiltiopropil)norcetamina **D** (no incluida dentro del alcance de la invención reivindicada) se prepara en seis etapas de acuerdo con la Figura 3 de los dibujos acompañantes. Se convierte norcetamina **4** primeramente en el derivado de metil carbamato **5** por reacción con metil cloroformato en benceno a reflujo en presencia de carbonato de sodio (Na₂CO₃). Se trata el metil carbamato **5** con diisopropilamida de litio (LDA) y cloruro de trimetilsililo (TMSiCl) en tetrahidrofurano (THF) a -78°C para producir el correspondiente trimetilsilil-enol éter **6**. La oxidación de **6** con ácido m-cloroperbenzóico (MCPBA) en presencia de Na₂CO₃ produce la 6-hidroxinorcetamina N-protegida **7**. La O-alkilación de **6** con bromuro de alilo en condiciones alcalinas produce al derivado **8**. La remoción del grupo de protección metoxicarbonilo de **8** por medio del uso de trimetilsililo yoduro, seguido por reacción con ácido tioacético en cloroformo a reflujo en presencia de 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) catalítico produce el
- 50

hapteno 6-O-(3'-acetiltiopropil)norcetamina D con un rendimiento moderado.

Preparación de Inmunógenos y Conjugados

- 5 Aunque los haptenos proporcionan epítomos estructurales definidos, por si mismos no son inmunogénicos y por lo tanto necesitan ser conjugados con materiales portadores, que provocarán una respuesta inmunogénica cuando se los administra a un animal huésped. Los materiales portadores apropiados comúnmente contienen segmentos de poli(aminoácido) e incluyen polipéptidos, proteínas y glicoproteínas. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son albúmina del suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo, gamma globulina bovina, globulina fijadora de tiroxina, hemocianina de lapa (KLH) etc. Alternativamente, se pueden emplear poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, como muchos otros materiales poliméricos naturales o sintéticos que soportan grupos funcionales reactivos. En particular, pueden conjugarse carbohidratos, levaduras o polisacáridos con el hapteno para producir un inmunógeno.
- 10
- 15 También puede acoplarse cada hapteno con un agente de marcación tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano), una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o un marcador radioactivo para la preparación de conjugados (o reactivos de detección) para uso en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado del mismo.
- 20 En la preparación de inmunógenos o conjugados con haptenos donde está presente un grupo, tal como, por ejemplo, haptenos **B**, **C** y **D**, se deben introducir primero grupos maleimida, halo o vinilsulfona al material portador o al agente marcador (enzima o etiqueta) utilizando enlazadores heterobifuncionales tales como: éster N-(g-maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBS); succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC); (m-maleimidobenzoil)-N-hidroxisuccinimida (MBS); succinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato (SMPB); N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB); la bromoacetilglicina N-hidroxisuccinimida; N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP); o vinilsulfona (Pierce Chemical Company, USA). El material portador así modificado o agente marcador puede ser conjugado luego a través de los grupos tiol sobre el hapteno, por ejemplo, haptenos **B**, **C** y **D**. Para haptenos sin un grupo tiol presente, tales como hapteno **A**, se lleva a cabo la conjugación sin modificación previa del material portador o del agente marcador utilizando métodos estándar de conjugación tales como anhídrido mezclado, EDC o activación del succinimidilo del hapteno. El hapteno D NO está incluido dentro del alcance de la invención reivindicada.
- 25
- 30

Con el propósito de confirmar que se ha logrado la adecuada conjugación del hapteno con el material portador, antes de la inmunización, se evalúa cada inmunógeno utilizando espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización con láser UV asistido por una matriz (MALDI-TOF MS). Cada uno de los inmunógenos de la presente invención es adecuado para inmunización, con el propósito de producir anticuerpos para la detección de cetamina y norcetamina.

35

Procedimiento general para análisis por MALDI-TOF de inmunógenos.

- 40 Se llevó a cabo la espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando un espectrómetro de masas de desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción de retraso. Se diluyó una alícuota de cada muestra que iba a ser analizada en ácido trifluoroacético acuoso al 0,1% (TFA) para crear soluciones de muestra de 1 mg/ml. Se analizaron alícuotas (1 µl) utilizando una matriz de ácido Sinapínico y se utilizó albúmina del suero bovino (Fluka) como calibrador externo. La Figura 5 de los dibujos acompañantes muestran el análisis para el material portador BSA. Como se verá, estaba presente una señal importante que indica una masa protonada promedio para esta muestra de m/z 66.404. La señal con m/z 33.200 es consistente con el componente principal en la forma doblemente cargada. Se observaron otras señales incluyendo m/z 13.605.
- 45

Preparación de antisuero

50

Con el propósito de generar antisueros policlonales, cada inmunógeno de la presente invención se mezcla con Adyuvante de Freund y se inyecta la mezcla en un animal huésped, tal como un conejo, oveja, ratón, conejillo de indias o caballo. Se aplican inyecciones adicionales (refuerzos) y se toman muestras de suero para la evaluación del

título del anticuerpo. Cuando se ha alcanzado el título óptimo, se desangra al animal huésped para obtener un volumen adecuado de antisuero específico. El grado requerido de purificación del anticuerpo depende de la aplicación pretendida. Para muchos propósitos, no se requiere purificación, sin embargo, en otros casos, tales como donde se lo debe inmovilizar sobre un soporte sólido, se deben realizar etapas de purificación para remover material indeseado y eliminar el enlazamiento no específico.

Los anticuerpos específicos preparados en esta invención son útiles como reactivos en inmunoensayos para la detección o determinación de cetamina y norcetamina en fluidos biológicos. Los anticuerpos de la presente invención son capaces de enlazarse con la unidad estructural arilciclohexanona, preferiblemente la unidad estructural clorofenilciclohexanona, más preferiblemente la unidad estructural o-clorofenilciclohexanona, de cetamina y de norcetamina.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de a-bromo-(o-clorofenil)ciclopentilcetona 2

Una solución de (o-clorofenil)ciclopentil cetona **1** (21,0 g, 0,1 moles) en 25 ml de tetracloruro de carbono anhidro bajo atmósfera inerte se le añadió, gota a gota a 0°C, bromo (16,17 g, 0,1 moles) en 100 ml de tetracloruro de carbono, durante un período de 30 minutos. Después de haber añadido todo el bromo, se formó una suspensión de color anaranjado. Se agita la suspensión durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se enjuagó utilizando una solución al 10% (p/v) de bisulfito de sodio (2 x 100 ml). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida hasta sequedad para producir la a-bromo-(o-clorofenil)ciclopentil cetona **2** (24,0 g, 83%) como un aceite de color amarillo oscuro, listo para ser usado sin purificación adicional en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2: Preparación de 1-[(o-clorofenil)iminometil]ciclopentanol 3

A una solución de amoníaco líquido (100 ml) a -78°C se le añadió en porciones durante un período de 1 hora el compuesto crudo **2** (24,0 g, 0,0834 mol). Se agita un nuevo la mezcla durante 4 horas y se permitió que se evaporara el amoníaco durante la noche. Se suspendió el residuo sólido obtenido en tetrahidrofurano y se removió el precipitado por filtración. Se concentró el filtrado a presión reducida y se trituró el residuo obtenido con éter de petróleo. Se removió el precipitado resultante por medio de filtración y se lo secó durante la noche sobre P₂O₅ para producir la base libre de 1-[(o-clorofenil)iminometil]ciclopentanol **3** como un sólido de color blanco (16,8 g, 90%).

IR (KBr): 3210,9; 1635,9; 763,3 cm⁻¹

RMN ¹³C (CDCl₃): 183,4; 138,2; 130,3; 130,0; 129,8; 127,2; 84,9; 38,6(2C); 23,6(2C) ppm.

P. F. (éter de petróleo): 88 - 90°C

Se preparó el clorhidrato de 1-[(o-clorofenil)iminometil]ciclopentanol **3** por disolución de 20 g (0,089 moles) de la base libre del compuesto **3** en 25 ml de isopropanol y a esta solución se le añadieron 100 ml de ácido clorhídrico (2 N) en éter dietílico. Se agitó luego la mezcla durante 10 minutos, y se filtró el precipitado obtenido, se lo lavó con éter dietílico y se lo secó para producir un sólido de color blanco del clorhidrato del compuesto **3** (23,14 g, 100%).

P. F.: 144 - 146°C

Ejemplo 3: Preparación de [2-amino-2-(o-clorofenil)]ciclohexanona (norcetamina) 4

A 250 ml de Dowtherm-A™ a 200°C se le añadió en una porción el clorhidrato del compuesto **3** (20 g, 0,077 moles) y se agitó la mezcla a 200°C durante 15 minutos. Se enfrió luego la mezcla de reacción a 10°C, y se removió el precipitado formado y se lo descartó por filtración. Se diluyó el filtrado en éter y se extrajo en agua (2 x 200 ml). Se lavaron con éter las fases acuosas combinadas, se las volvió alcalinas con hidróxido de sodio 6 N y se extrajo en éter (2 x 150 ml). Se lavaron las capas etéreas combinadas con agua, se las secó y concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo obtenido por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (70% de hexano/ 30% de acetato de etilo) para producir una base libre de norcetamina (13,75 g, 80%) **4** como un aceite incoloro.

IR (película): 3381,47; 3310,15; 3064,46; 1939,96; 2864,94; 1712,61 y 757,0,

RMN ¹³C (CDCl₃): 212,85; 140,47; 133,11; 131,08; 129,01; 128,36; 127,24; 66,52; 41,35; 39,06; 28,42; 22,23 (Figura 10).

5 Ejemplo 4: Preparación del hapteno A de la N-(4'-carboxipropil)norcetamina

A una solución al 15% de semialdehído succínico (5 ml, 8,018 mmoles, 811,7 mg) se le añadió tetrahidrofurano (20 ml), norcetamina **4** (1,38 g, 6,17 mmoles) y cianoborhidruro de sodio (388 mg, 6,17 mmoles) a 0°C. Se agitó la mezcla durante dos horas a temperatura ambiente y la cromatografía en capa delgada (10% de metanol en cloroformo) confirmó que el material de partida (norcetamina **4**) ya no estaba presente. A esta solución se le añadieron 20 ml de ácido clorhídrico 1 N y se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora adicional. Se evaporó el tetrahidrofurano a presión reducida y se neutralizó la solución acuosa restante a pH 7 con hidróxido de sodio (1 N) y se extrajo en cloroformo (3 x 50 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con solución de bicarbonato de sodio al 5% (50 ml), agua (50ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo obtenido por medio de cromatografía sobre gel de sílice (10% de metanol en cloroformo) para producir 0,8 g (38,8%) de N-(4'-carboxipropil)norcetamina (Hapteno **A**) como una espuma higroscópica de color blanco.

IR (película): 3354,76; 3056,10; 1721,05; 1265,70; 736,68

20 RMN ¹³C (CDCl₃): 208,26; 175,37; 135,33; 134,27; 131,47; 129,85; 129,76; 127,08; 70,49; 42,72; 39,02; 38,21; 34,7; 29,01; 24,54; 21,93 (Figura 11).

Ejemplo 5: Preparación del hapteno B de la N-(3'-acetiltiopropil)norcetamina

25 A una solución de norcetamina **4** (2,5 g, 0,011 moles) en 50 ml de etanol absoluto se le añadió trietilamina, TEA, (2 ml) y iodopropiltioacetato (2,95 g, 0,0121 moles). Se agitó la mezcla a reflujo durante 48 horas (la TLC mostró que la reacción estaba completa). Se evaporó la solución hasta sequedad y se purificó el residuo obtenido por medio de cromatografía sobre gel de sílice (60% de hexano / 40% de acetato de etilo) para producir 1,8 g (48%) de N-(3'-acetiltiopropil)norcetamina (Hapteno **B**) como un aceite de color amarillo claro.

30 IR (película): 3354.33; 3063.62; 2937.2; 2863.86; 1692.95 (br) y 757.97

RMN ¹³C (CDCl₃): 209,27; 196,51; 138,84; 134,11; 131,6; 129,52; 129,04; 127,06; 70,21; 41,2; 39,83; 39,6; 30,99; 30,92; 28,22; 27,15 y 22,2 (Figura 12).

35 Ejemplo 6: Preparación del hapteno C de la N-(3'-acetiltiopropionamido)norcetamina.

A una solución de norcetamina **4** (2,5 g, 0,011 moles) en 10 ml de DMF anhidro bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió ácido 3-acetiltiopropiónico (1,79 g, 0,012 moles), clorhidrato de EDC (2,53 g, 0,013 moles) y piridina (1,9 g, 0,024 moles). Se agitó luego la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas (la TLC indicó que no queda material de partida en la reacción). Se evaporó la mezcla hasta sequedad, y se purificó el producto crudo obtenido por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (50% de hexano / 50% de acetato de etilo) para producir 2,3 g (62%) de la N-(3'-acetiltiopropionamido)norcetamina (Hapteno **C**) como un aceite de color amarillo.

45 IR (película): 3353,79; 3066,59; 2944,2; 2867,78; 1736,06; 1682 (br) y 760,16.

Ejemplo 7: Conjugación del hapteno A con BSA - inmunógeno A

Se disolvieron 104 mg de clorhidrato de EDC en agua (0,5 ml) e inmediatamente se lo añadió a una solución de hapteno **A** (70 mg, 0,22 mmoles) en DMF (1 ml). Después de la mezcla, se añadió esta solución a una solución de BSA (200 mg) en 10 ml de agua. Se añadió inmediatamente sulfo-NHS (52 mg) y se incubó la mezcla de reacción, con agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se dializó luego la mezcla contra una solución salina amortiguada de fosfato (PBS), pH 7,2, (3 cambios) durante 24 horas, y se liofilizó.

Por MALDI-TOF (ver la Figura 6 de los dibujos acompañantes), estaba presente una señal que indica una masa

protonada promedio para esta muestra de m/z 69.227. Estos datos sugieren que se han conjugado un promedio de 9,7 moléculas de Hapteno **A** por molécula de BSA.

Ejemplo 8: Preparación de albúmina del suero bovino modificada con la bromoacetilglicina

A una solución de BSA (1 g) en amortiguador de borato 0,1 M (pH 8,5, 45 ml), enfriada a 0°C, se le añadió gota a gota N-succinimidil la bromoacetilglicina (0,375 g, 0,13 mmoles) en DMF (5 ml). Durante la adición, se mantuvo el pH en 8,0 y se agitó la solución a 0°C durante una hora. Se ajustó en pH en 7 y se dializó la solución durante 24 horas a 4°C contra agua destilada (3 cambios). Se liofilizó luego la solución para producir 990 mg de BSA modificada con la bromoacetilglicina.

Por MALDI-TOF (ver la Figura 7 de los dibujos acompañantes), estaba presente una señal principal que indica una masa protonada promedio para esta muestra de m/z 73.264. La señal con un m/z 36.644 es consistente con el componente principal en la forma doblemente cargada. Estos datos sugieren que se modificaron un promedio de 38,6 grupos de lisina con la la bromoacetilglicina.

Ejemplo 9: Conjugación de hapteno B con BSA-inmunógeno B modificado con la bromoacetilglicina

Se disolvió Hapteno **B** (70 mg) en 1 ml de carbonato de potasio 0,12 M en 80% de metanol / 20% de agua, la muestra fue luego colocada bajo atmósfera de nitrógeno durante 10 a 15 minutos (la TLC no mostró que no quedó hapteno **B** y la formación de un nuevo compuesto con un R_f menor). Se añadió amortiguador de fosfato (1 ml - pH 7) para detener la reacción y se ajustó el pH en 7 por medio de la adición de unas pocas gotas de HCl 0,5 M. Se añadió esta solución gota a gota a una solución del BSA modificada (200 mg en 10 ml de agua) y se agitó la solución resultante a 4°C durante la noche (protegida de la luz). Se dializó la solución contra agua destilada durante 24 horas (3 cambios) y se liofilizó.

Por MALDI-TOF (ver la Figura 8 de los dibujos acompañantes), estaba presente una señal principal que indica una masa protonada promedio para esta muestra de m/z 75.860. La señal con un m/z 38.077 es consistente con el componente principal en la forma doblemente cargada. Estos datos sugieren que se han conjugado un promedio de 8,8 moléculas de Hapteno **B** por molécula de BSA modificada con la bromoacetilglicina.

Ejemplo 10: Conjugación del hapteno C con BSA-inmunógeno C modificado con la bromoacetilglicina

Se conjugó hapteno **C** con BSA modificada con la bromoacetilglicina utilizando el mismo método usado para el hapteno **B** (Ejemplo 9).

Por MALDI-TOF (ver la Figura 9 de los dibujos acompañantes), estaba presente una señal que indica una masa protonada promedio para esta muestra de m/z 76.424. La señal con un m/z 38.050 es consistente con el componente principal en la forma doblemente cargada. Estos datos sugieren que se han conjugado un promedio de 10,2 moléculas de Hapteno **C** por molécula de BSA modificada con la bromoacetilglicina.

Ejemplo 11: Conjugación del hapteno A con HRP - conjugado A

Se disolvieron 10 mg de clorhidrato de EDC en 800 μ l de agua e inmediatamente se los añadió a una solución de 2 mg de hapteno **A** en 200 μ l de DMF. Después de la mezcla, se añadió esta solución a HRP (20 mg) en 1ml de agua. Se añadió inmediatamente sulfo-NHS (5 mg) y se incubó la mezcla de reacción en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se removió el exceso de hapteno por desalinización con 2 columnas PD-10 (Pharmacia) en serie, previamente equilibradas con PBS a pH 7,2. Se dializó luego el conjugado de hapteno-HRP durante la noche contra 10 L de PBS, pH 7,2, a 4°C.

Ejemplo 12: Preparación de HRP modificado con la bromoacetilglicina

Se llevó a cabo la preparación de HRP modificado con la bromoacetilglicina por medio del método descrito en el Ejemplo 8.

Ejemplo 13: Conjugación del hapteno B con HRP-conjugado B modificado con la bromoacetilglicina

Se disolvieron 10 mg de hapteno **B** en 0,5 ml de solución de carbonato de potasio 0,12 M (80% de metanol/ 20% de agua). Se dejó la solución resultante durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió 1 ml de amortiguador de fosfato 50 mM, pH 7, a la solución para detener la reacción y se ajustó el pH en 7 - 7,5 utilizando HCl 0,5 M. Se añadieron gota a gota 500 µl de esta solución a una solución del HRP modificada con la bromoacetilglicina del Ejemplo 12 (20 mg en 1 ml de agua) y se agitó la mezcla en la oscuridad durante la noche a 4°C. Se purificó luego el conjugado de hapteno-HRP utilizando dos columnas PD-10 (Pharmacia Biotechnol), eluidas con PBS, pH 7,2, y se dializó durante la noche contra 10 L de agua.

Ejemplo 14: Conjugación del hapteno C con HRP - conjugado C modificado con la bromoacetilglicina

Se conjugó hapteno **C** con HRP modificado con la bromoacetilglicina por medio del mismo método utilizado para el hapteno **B** en el Ejemplo 13.

Ejemplo 15: Preparación de anticuerpos con inmunógeno C, preparado en el Ejemplo 10.

Se formuló una solución acuosa del inmunógeno preparado en el Ejemplo 10 con Adyuvante Completo de Freund (FCA) para formar una emulsión que consiste de 4 mg/ml de inmunógeno en FCA al 50% (v/v). Se inmunizaron tres ovejas con esta emulsión (1° inmunización), inyectando 0,25 ml en forma subcutánea en cada uno de cuatro sitios en el flanco de cada animal. La siguiente inmunización (refuerzo 1) contenía 2 mg/ml de inmunógeno y las inmunizaciones posteriores (refuerzos 2 a 11) contenían 1 mg/ml de inmunógeno. Todos los refuerzos se emulsionaron en Adyuvante Incompleto de Freund al 50% (v/v) (FIA) y se los administró en la misma forma que la 1° inmunización, con intervalos mensuales durante 1 año. Se tomaron muestras de sangre 7 a 14 días después de cada refuerzo. Se procesó cada muestra para producir suero, que fue purificado adicionalmente por medio de ácido caprílico y precipitación con sulfato de amonio para producir una fracción de inmunoglobulina G (IgG). Se evaluó la fracción de la IgG por medio de un ensayo de ELISA competitivo en placas de microtitulación, como se describe en el Ejemplo 16 a continuación.

Ejemplo 16: Desarrollo de un ELISA competitivo para cetamina y norcetamina.

Se recubrieron los pozos de una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pozos de enlazamiento mejorado con la fracción de IgG del suero elevado con el inmunógeno C (hapteno C-BSA) (Ejemplo 10), se diluyó en Tris 10 mM, pH 8,5 (125 µl/pozo). Se determinó la dilución apropiada de recubrimiento de anticuerpo utilizando técnicas estándar de tablero de ajedrez para ELISA. Se incubó la placa durante 2 horas a 37°C, se lavó 4 veces con solución salina amortiguada con Tris que contenía Tween 20 (TBST) y se asentó seca. Se prepararon soluciones estándar de cetamina y norcetamina en TBST a razón de 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 25, 100 y 500 ng/ml y se añadieron 50 µl de cada una a los pozos apropiados (Figura 4). Se añadieron 75 µl de conjugado A (hapteno A-HRP) (Ejemplo 11), se diluyó en amortiguador Tris (pH 7,2) que contenía EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA, a cada uno de los pozos, como se muestra en la Figura 4. Se determinó también la dilución apropiada de conjugado utilizando técnicas estándar de tablero de ajedrez para ELISA. Se incubó la placa a 37°C durante 2 horas. Se removió el exceso de conjugado no enlazado lavando 6 veces durante un período de 10 minutos con TBST.

Se añadieron 125 µl de la solución del sustrato de tetrametilbencidina (TMB) a cada pozo de la placa que fue luego incubada durante 15 a 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se terminó la reacción por medio de la adición de 125 µl de H₂SO₄ 0,2 M a cada pozo. Se midió luego la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas de microtitulación. Los datos generados en el ensayo se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Datos generados a partir de un ensayo competitivo en una placa de microtitulación para cetamina y norcetamina, empleando suero elevado con inmunógeno C (hapteno C-BSA) (Ejemplo 10) y conjugado A (hapteno A-HRP) como un reactivo de detección (Ejemplo 11)

Concentración Estándar ng/ml	Cetamina		Norcetamina	
	A ₄₅₀	%B/B ₀	A ₄₅₀	%B/B ₀
0	2,194	100,0	2,121	100,0
0,1	2,02	92,1	1,843	86,9
0,5	1,817	82,8	1,416	66,8
1	1,489	67,9	1,368	64,5
5	0,935	42,6	0,961	45,3
25	0,548	25,0	0,482	22,7
100	0,404	18,4	0,320	15,1
500	0,254	11,6	0,222	10,5
IC ₅₀	2,9 ng/ml		2,1 ng/ml	
%CR	100,0		138,1	
A ₄₅₀ = absorbancia a 450 nm B = absorbancia a 450 nm con una concentración estándar de x ng/ml B ₀ = absorbancia a 450 nm con una concentración estándar de 0 ng/ml IC ₅₀ = concentración estándar que produce 50% B/B ₀ %CR = porcentaje de reactividad cruzada con base en la especificidad con cetamina- esto es lo que se entiende por el término "reactividad cruzada" en la presente descripción.				

Ejemplo 17: Reactividad cruzada del ELISA comparativo para cetamina y norcetamina.

5

Con el propósito de determinar la especificidad del ELISA comparativo para cetamina y norcetamina, se prepararon soluciones estándar de TBST a razón de 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 25, 100 y 500 ng/ml. Empleando cada serie de estándares en el ELISA competitivo de cetamina, se generaron curvas de calibración y éstas fueron utilizadas para determinar la reactividad cruzada del inmunoensayo con estas sustancias. Los resultados de este estudio se presentan en la

10

Tabla 2, siendo calculada la reactividad cruzada de los reactivos potenciales de cruzamiento fenciclidina y dextrometorfano de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%CR = IC_{50, \text{Cetamina}} / IC_{50, CR} \times 100$$

15

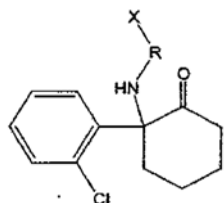
Donde el %CR es el porcentaje de reactividad cruzada, IC₅₀, Cetamina es la concentración de cetamina que provoca 50% del desplazamiento de la señal y de IC₅₀, CR es la concentración del reactivo de cruzamiento potencial que provoca 50% del desplazamiento de la señal.

Tabla 2: Reactividad cruzada del ELISA competitivo para cetamina y norcetamina

Reactivo de cruzamiento	IC _{50, CR} (ng/ml)	% CR
Fenciclidina	> 500,0	< 0,58
Dextrometorfano	> 500,0	< 0,58
IC _{50, CR} = concentración del reactivo de cruzamiento potencial que provoca 50% del desplazamiento de la señal % CR = porcentaje de reactividad cruzada con base en la especificidad con la cetamina		

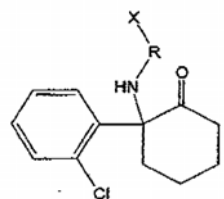
REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno para uso en la elevación de anticuerpos para detectar cetamina y norcetamina, comprendiendo el inmunógeno un hapteno de la norcetamina con derivación en el nitrógeno de la norcetamina; en el cual el hapteno de la norcetamina tiene la siguiente fórmula estructural:



en la cual R se selecciona del grupo que incluye una unidad estructural de alquileo de cadena recta o ramificada, sustituida o no sustituida, saturada o insaturada; y X se selecciona del grupo que incluye un ácido carboxílico o un éster del mismo; una amina, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster del mismo, un aldehído, una unidad estructural de ditiopiridilo, una unidad estructural de vinilsulfona o un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo y el hapteno está acoplado a un material portador que confiere antigenicidad.

2. Un conjugado que comprende un hapteno de la norcetamina con derivación en el nitrógeno de la norcetamina; en el cual el hapteno de la norcetamina tiene la siguiente fórmula estructural:



en la cual R se selecciona del grupo que incluye una unidad estructural de alquileo de cadena recta o ramificada, sustituida o no sustituida, saturada o insaturada; y X se selecciona del grupo que incluye un ácido carboxílico o un éster del mismo; una amina, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster del mismo, un aldehído, una unidad estructural de ditiopiridilo, una unidad estructural de vinilsulfona o un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo y el hapteno está covalentemente enlazado con un agente de marcación detectable.

3. Un inmunógeno de acuerdo con la Reivindicación 1 o un conjugado de acuerdo con la Reivindicación 2, en el cual R es una unidad estructural de alquileo C_{1-5} , saturada, de cadena recta, sustituida o no sustituida.

4. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la Reivindicación 3, en el cual R es una unidad estructural de alquileo C_3 , saturada, de cadena recta, sustituida o no sustituida.

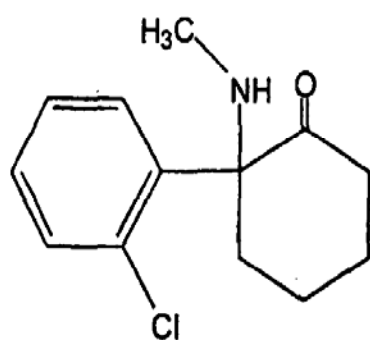
5. Un inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1, 3 ó 4 o un conjugado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 4, en el cual X se selecciona de una unidad estructural de ácido carboxílico, un ácido tiocarboxílico, un ditiopiridilo, una maleimida, o un aldehído.

6. Un inmunógeno o un conjugado de acuerdo con la Reivindicación 5, en el cual X se selecciona de $COOH$ o $SCOCH_3$.

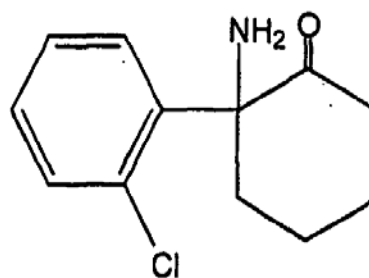
7. Un inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 ó 3 a 6 o un conjugado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 6, en el cual el hapteno de la norcetamina se selecciona de los siguientes derivados del hapteno de la norcetamina: N-(4'-carboxipropil) norcetamina; N-(3'-acetiltiopropil)norcetamina; y N-(3'-acetiltiopropionamido)norcetamina.

8. Un inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 3 a 7, en el cual el material portador se selecciona de una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético.
- 5 9. Anticuerpos producidos contra el inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 3 a 8, siendo capaces los anticuerpos de enlazamiento con al menos un epítipo estructural de norcetamina o cetamina.
- 10 10. Anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 9, en los cuales el epítipo estructural es una unidad estructural de arilciclohexanona.
- 15 11. Anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 10, en los cuales el epítipo estructural es una unidad estructural de clorofenilciclohexanona.
- 20 12. Anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 11, en los cuales el epítipo estructural es una unidad estructural de o-clorofenilciclohexanona.
- 25 13. El conjugado de cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 7, en el cual el agente de marcación se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva, o una mezcla de los mismos.
- 30 14. Un método *in vitro* para detectar cetamina y norcetamina en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con el conjugado de cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 7 y 13, o una mezcla de los mismos, y con los anticuerpos de cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 12, o una mezcla de los mismos; la detección o determinación del conjugado enlazado; y la deducción a partir de una curva de calibración de la presencia de cetamina y norcetamina en la muestra.
- 35 15. Un kit para detectar cetamina y norcetamina, incluyendo el kit al conjugado de cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 7 y 13, o una mezcla de los mismos; y los anticuerpos de cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 12, o una mezcla de los mismos.
- 40 16. El uso *in vitro* de los conjugados de cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 7 y 13, o una mezcla de los mismos, con los anticuerpos de cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 12, o una mezcla de los mismos, para detectar cetamina y norcetamina en muestras tales como fluidos biológicos.
- 45
- 50

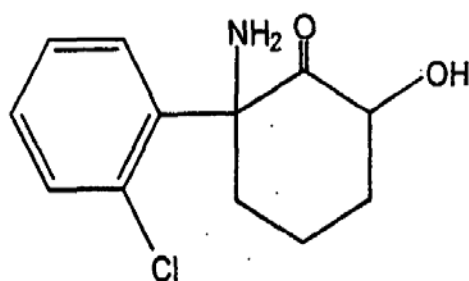
Figura 1 Estructuras de cetamina y sus metabolitos



Cetamina



Norcetamina



6-Hidroxi norcetamina

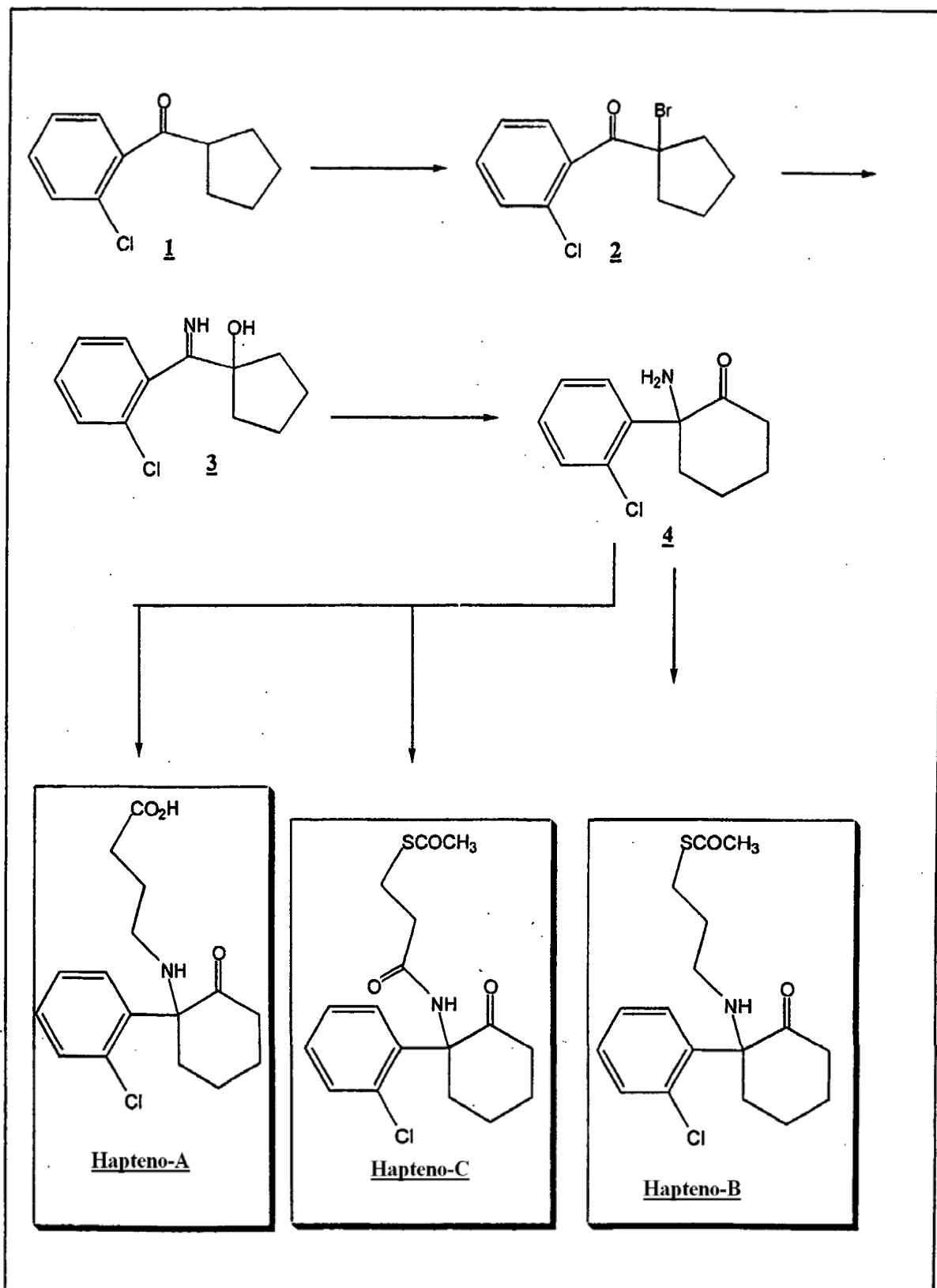
Figura 2: Esquema de reacción para la preparación de los Haptenos A, B y C

Figura 3: Reacciones químicas para la preparación del Hapteno D
 (No incluido dentro del alcance de la invención reivindicada)

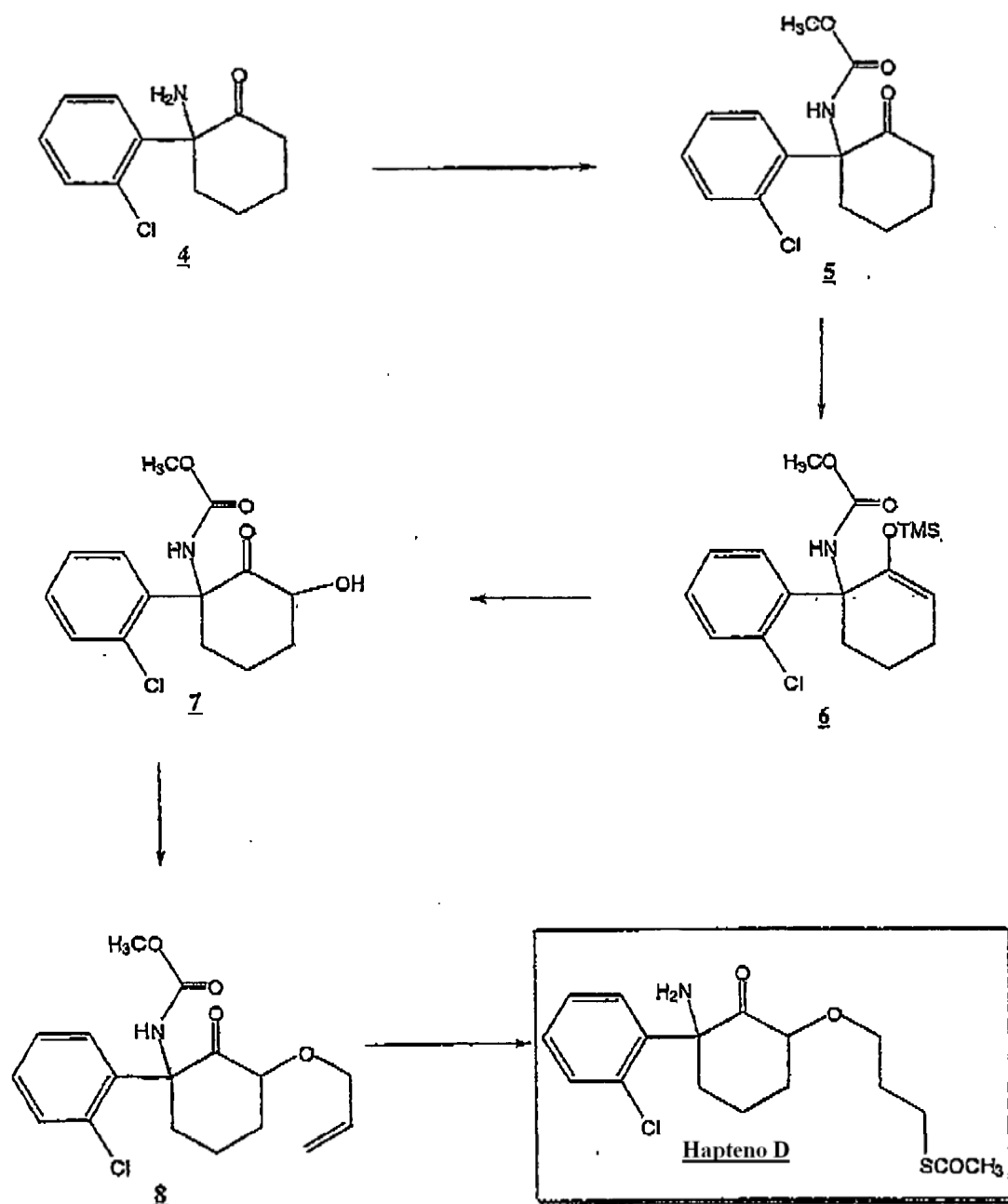
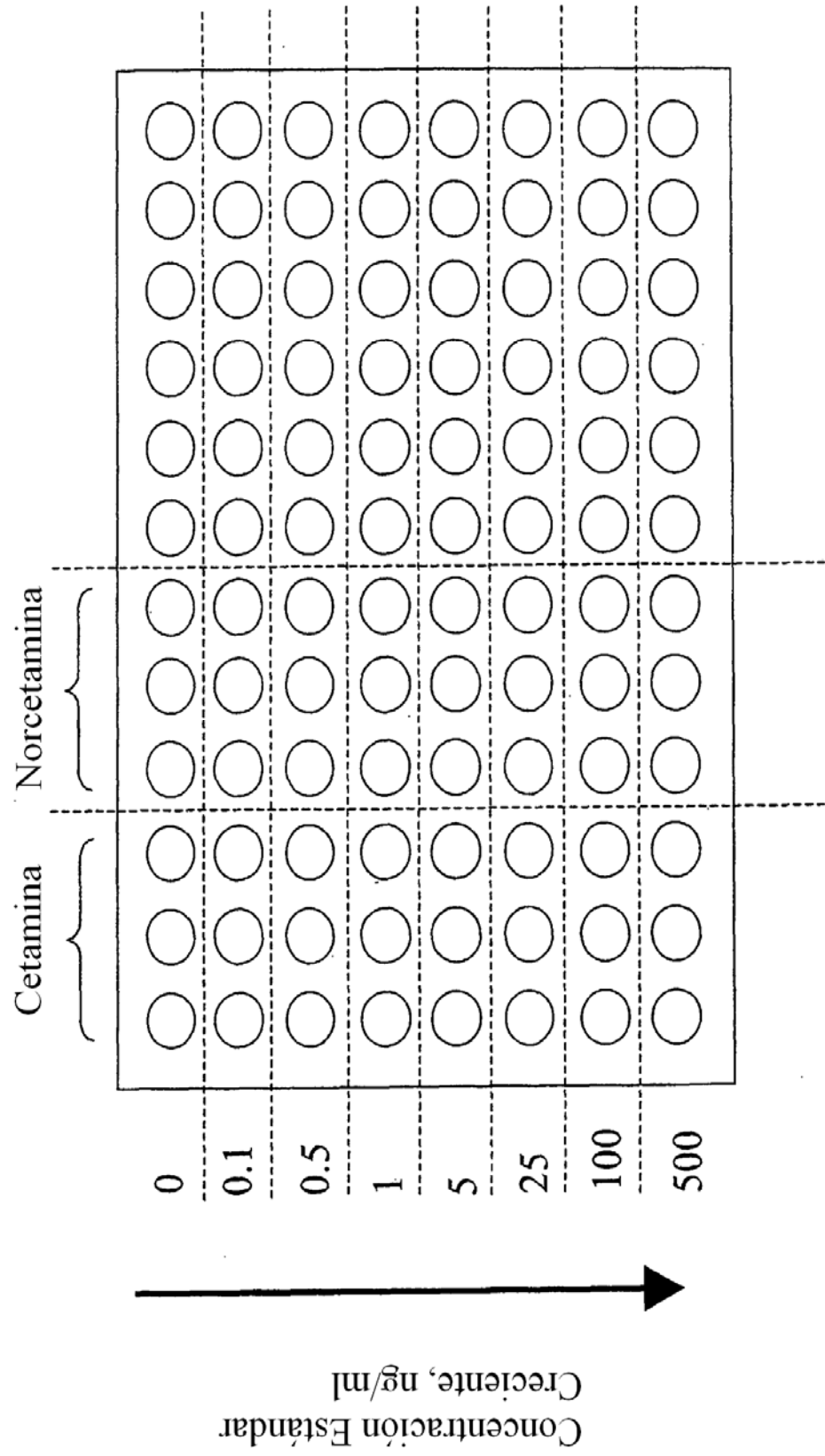


Figura 4: Ensayo en Placa de Microtitulación de ELISA Competitivo para Cetamina y Norcetamina



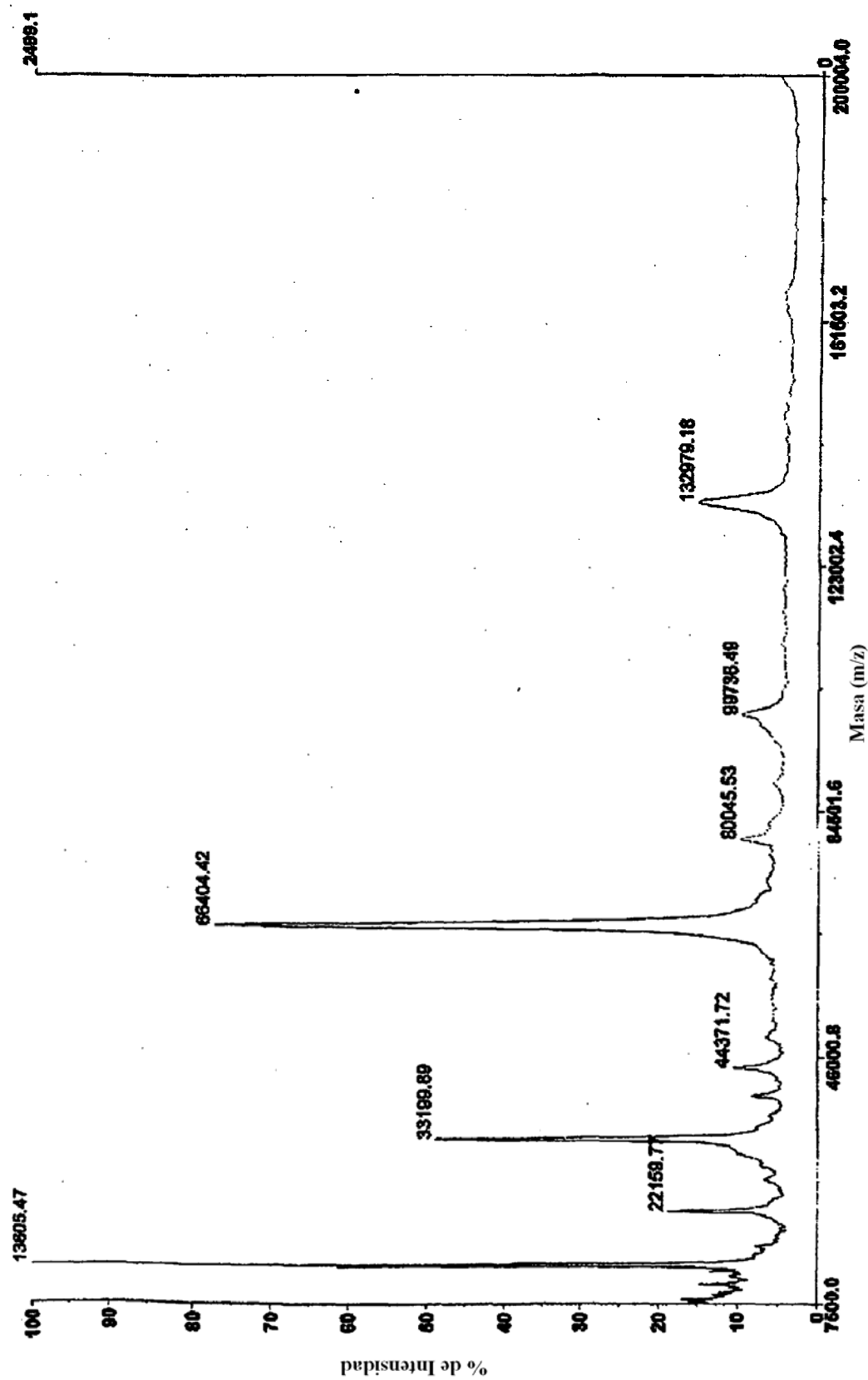


Figura 5: Material Portador de BSA

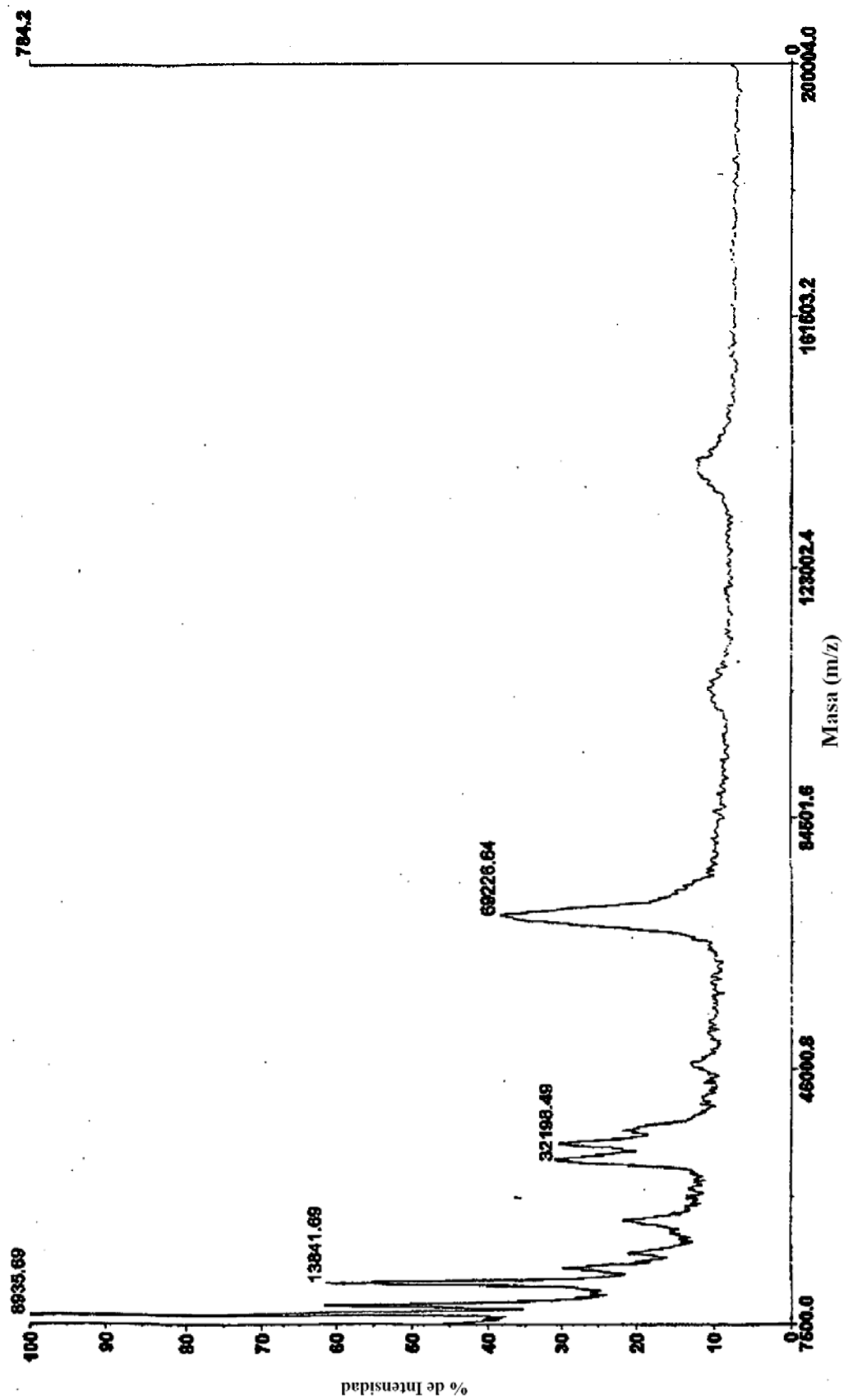


Figura 6: Inmunógeno A

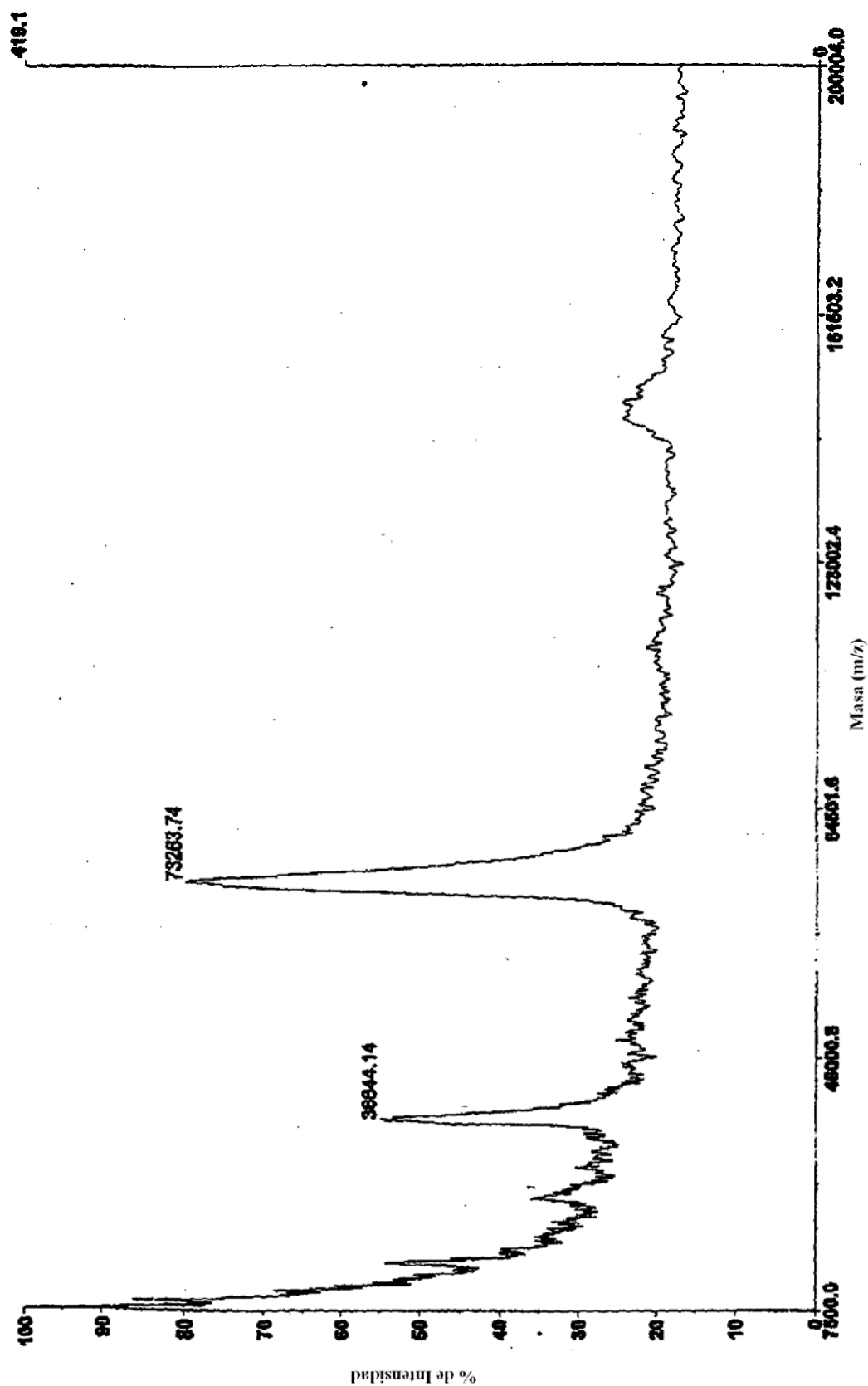


Figura 7: BSA Modificado con Bromoacetylglutidina

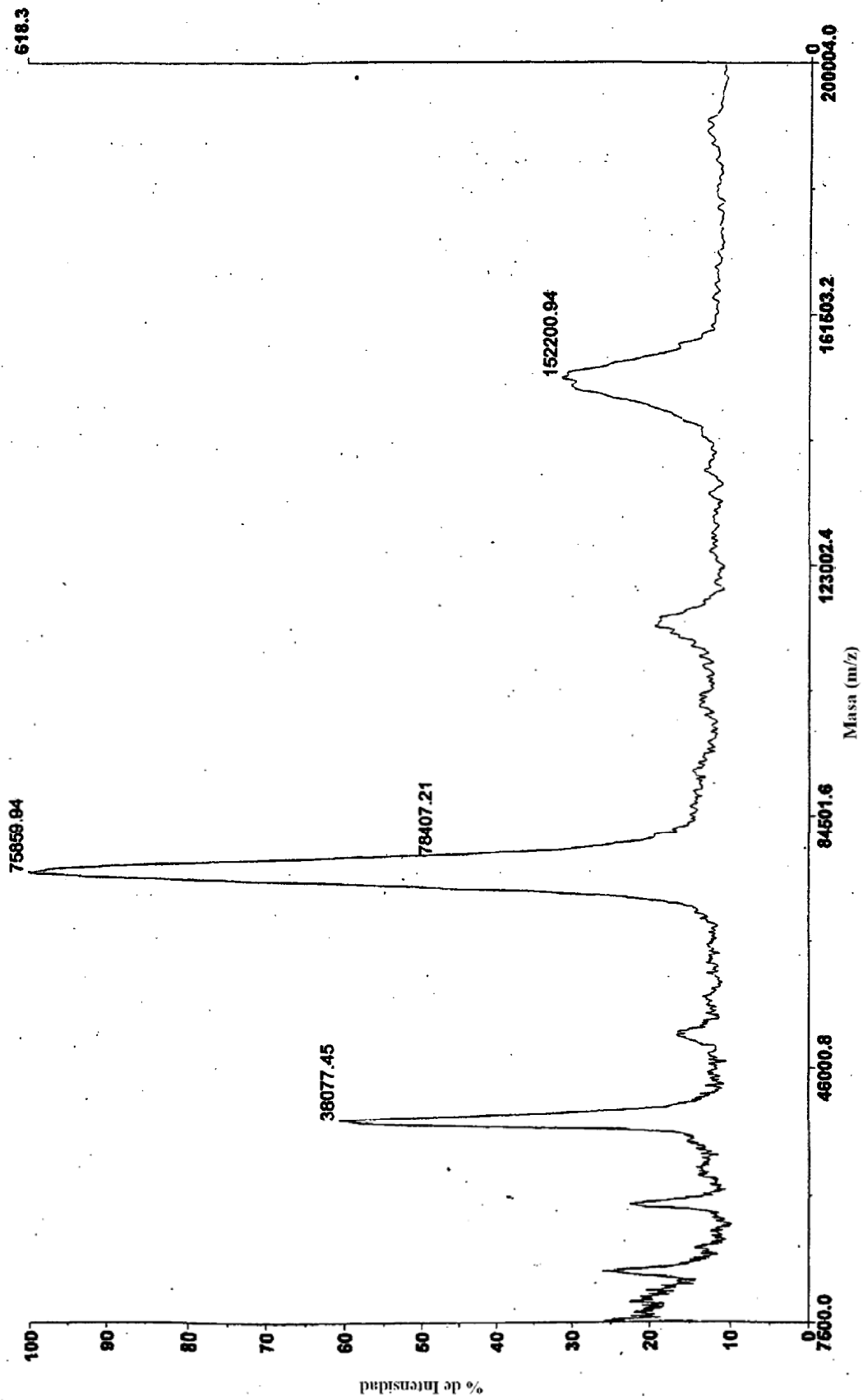


Figura 8: Inmunógeno B

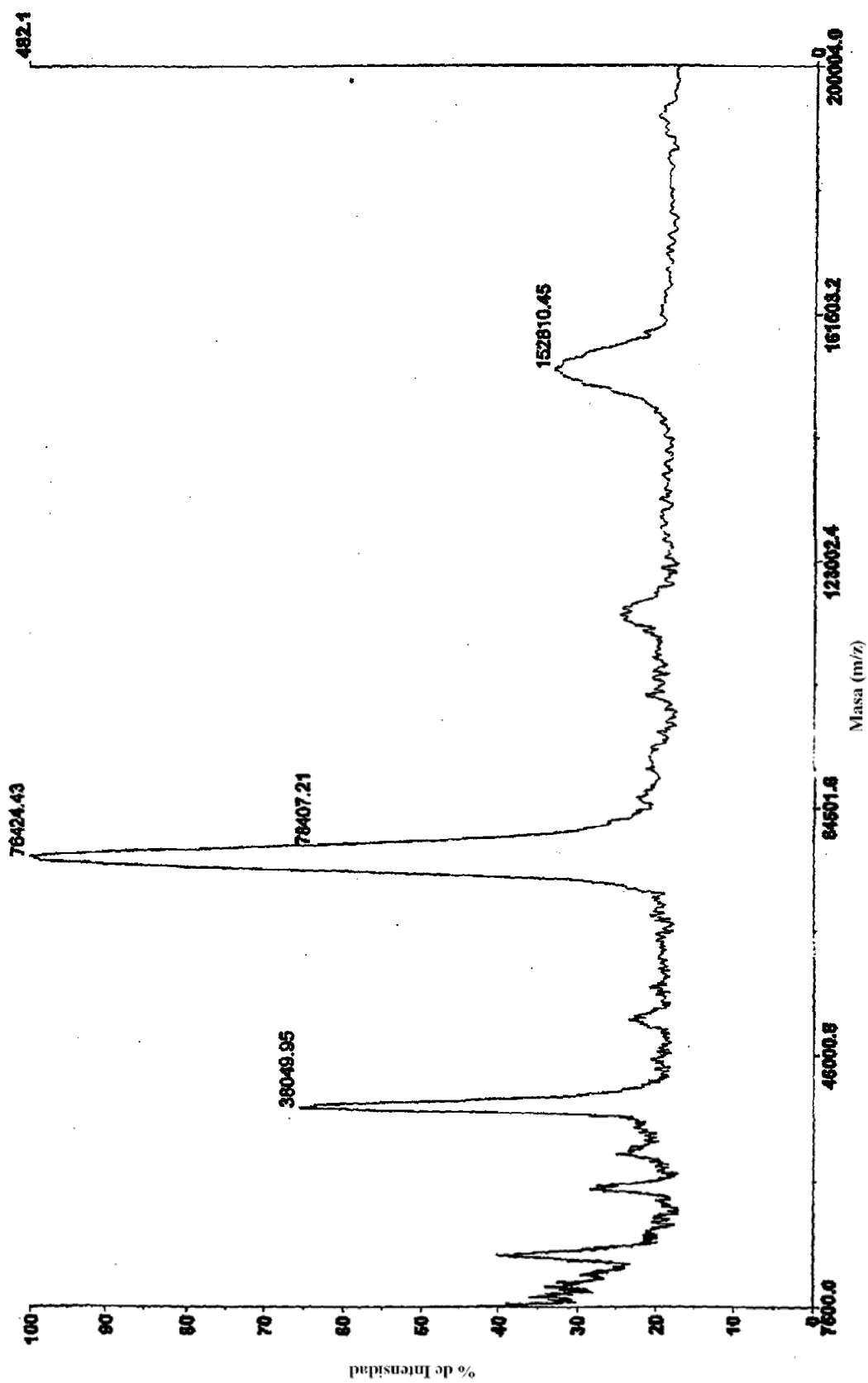


Figura 9: Inmunógeno C

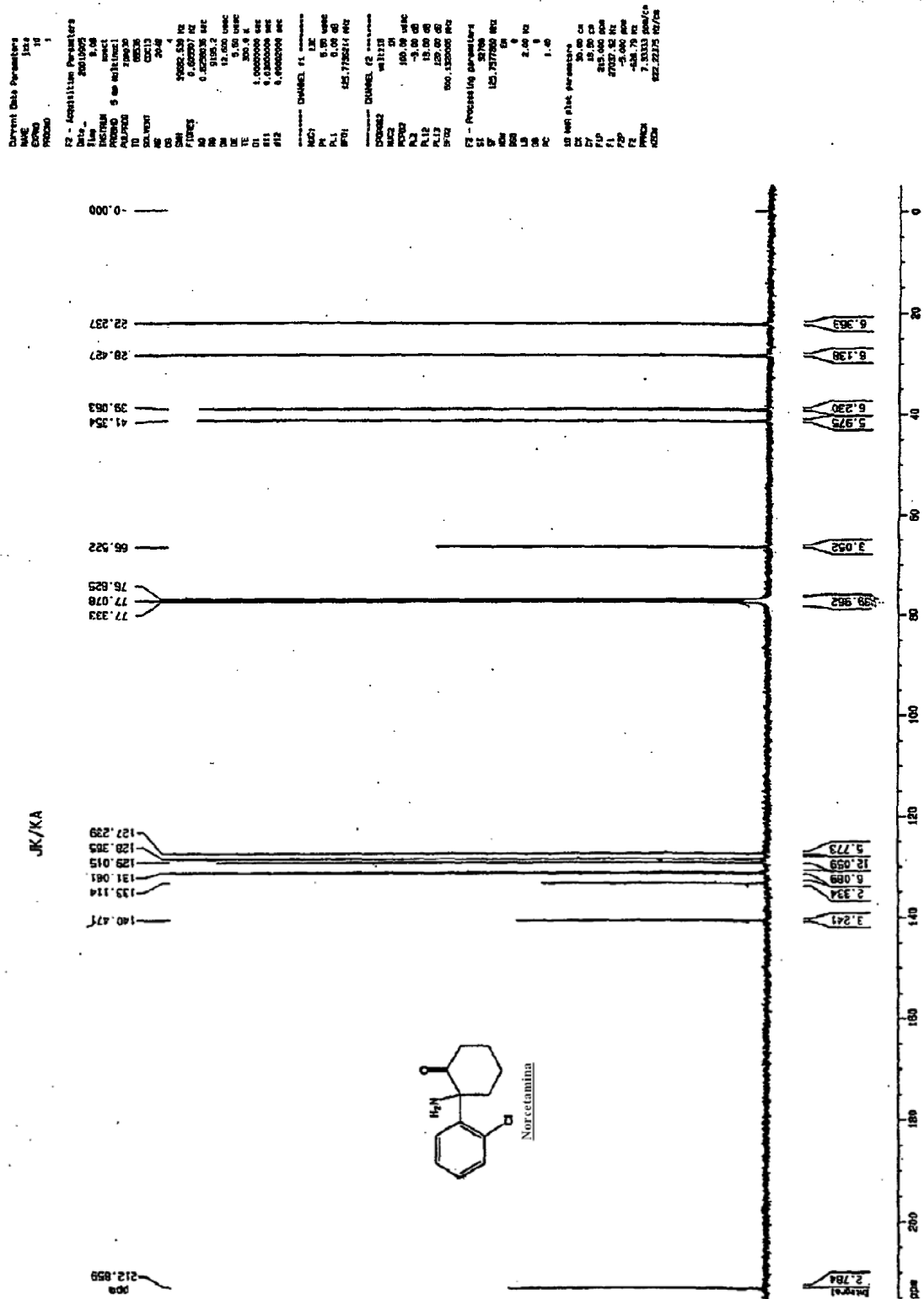


Figura 10

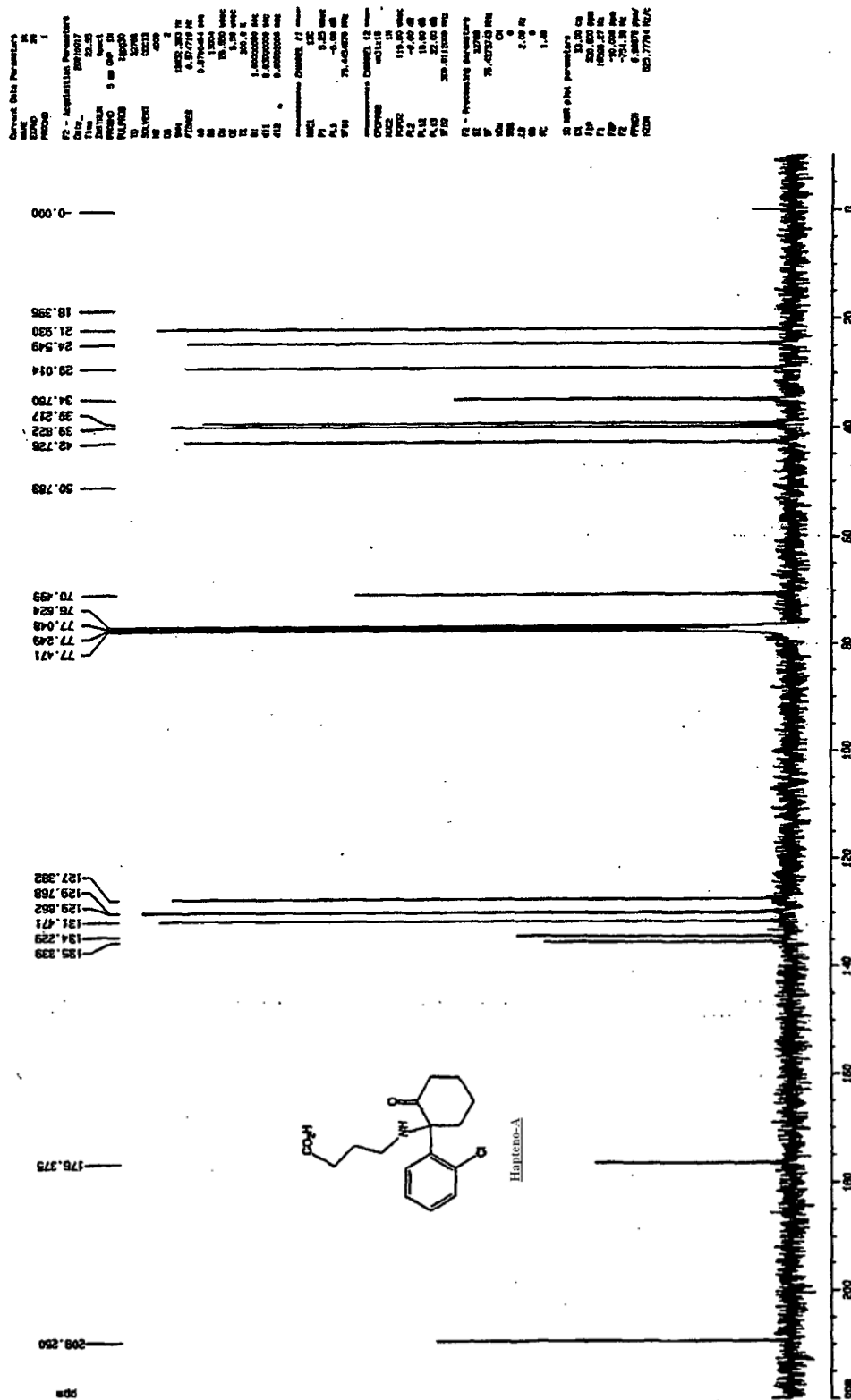


Figura 11

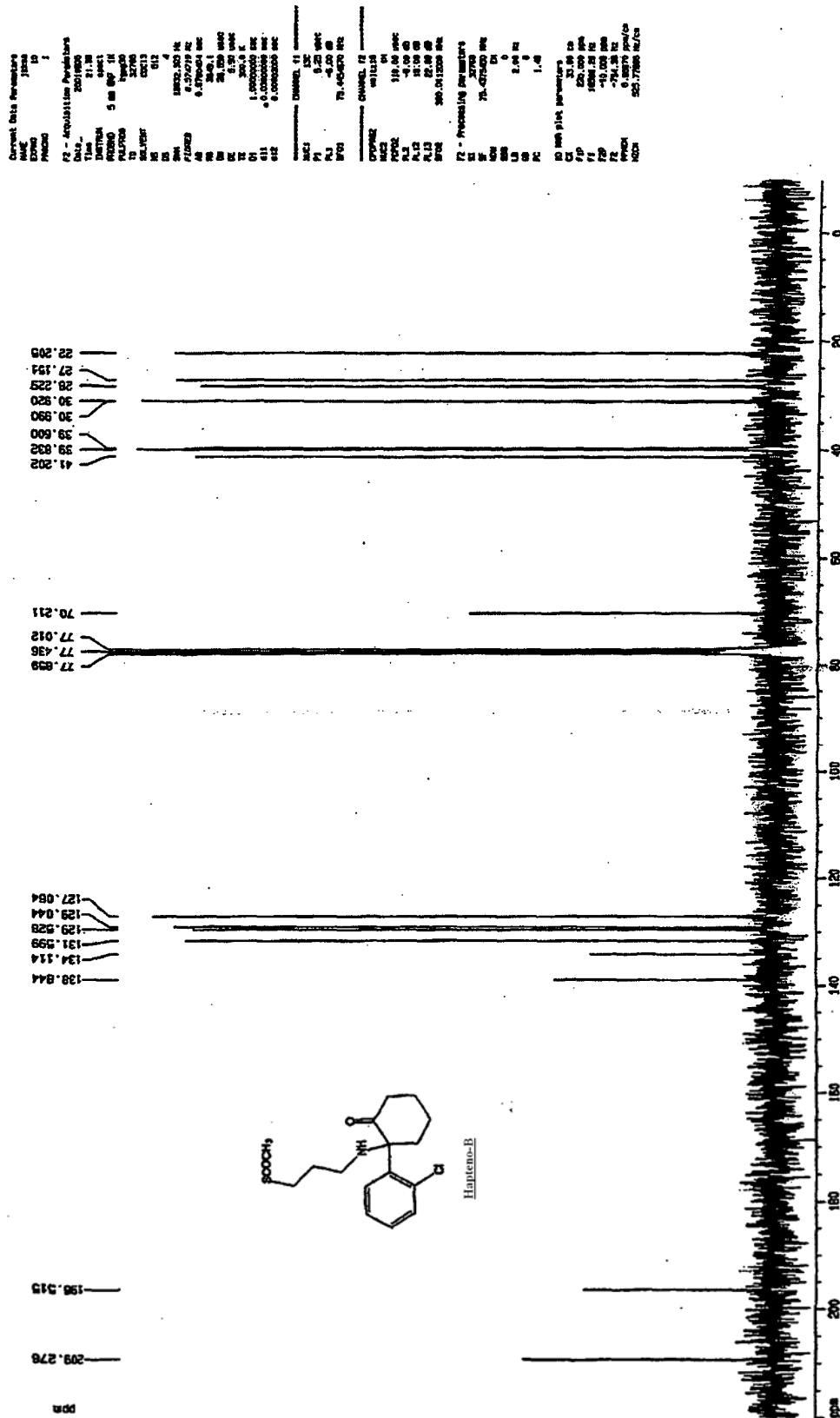


Figure 12

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 02075445 A [0009]
- EP 0459387 A2 [0010]

Literatura citada en la descripción que no es de patente:

- **Owens et al.** Antibodies against arylcyclohexylamines and their similarities in binding specificity with the phencyclidine receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1988, vol. 246 (2), 472 - 478 [0011]
- **Owens et al.** Molecular requirements for an immunological model of the phencyclidine receptor. Sigma and PCP-Like Compounds as Molecular Probes in Biology, 1988 [0012]
- **Leung et al.** Comparative pharmacology in the rat of ketamine and its two principal metabolites, norketamine and (z)-6-hydroxynorketamine. J. Med. Chem., 1986, vol. 29 (11), 2396 - 2399 [0013]