



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 907**

51 Int. Cl.:

**C07D 457/06** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

**G01N 33/532** (2006.01)

**G01N 33/536** (2006.01)

**A61K 31/48** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02080687 .3**

96 Fecha de presentación : **17.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1321466**

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

54

Título: **Haptenos, inmunógenos, anticuerpos y conjugados para LSD 2-oxo-3-hidroxi.**

30

Prioridad: **20.12.2001 EP 01205057**

73

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

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.06.2011**

72

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

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.06.2011**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 361 907 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

Haptenos, Inmunógenos, Anticuerpos y Conjugados para LSD 2-oxo-3-hidroxi

Antecedente

5 La presente invención se relaciona con haptenos que se utilizan para la preparación de inmunógenos, anticuerpos y conjugados para uso en inmunoensayos competitivos para la detección del metabolito LSD principal, 2-oxo-3-hidroxi-LSD.

La presente invención también se relaciona con un método y equipo para detectar o determinar 2-oxo-3-hidroxi-LSD. El método y equipo de la presente invención están destinados a no reaccionar significativamente en forma cruzada con el LSD progenitor en sí mismo o con nor-LSD.

10 "Detectar" significa analizar cualitativamente la presencia o ausencia de una sustancia.

"Determinar" significa analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia.

El ácido dietilamida lisérgico (LSD) (Figura 1, 1) es un compuesto psicoactivo poderoso. Este se clasifica como un fármaco de Esquema I. El compuesto está disponible en píldoras, soluciones y cubos de azúcar impregnados, papel secante o comprimidos de vitamina.

15 El LSD es un halucinógeno muy potente, 10-150 veces tan potente como silocibina y 4500-9275 veces tan potente como mescalina. El compuesto isomérico d-iso-LSD (Figura 1, 2) es inactivo.

20 Con las crecientes restricciones en la administración del LSD a sujetos humanos, se limita el conocimiento actual en la distribución, el perfil metabólico y la extracción de LSD en el hombre. Un número considerable de reportes está disponible sobre la distribución y el perfil metabólico de LSD en animales en donde los metabolitos más comunes encontrados son nor-LSD (Figura 1, 3), 2-oxo-3- hidroxi-LSD (Figura 1, 4), 2-oxo-LSD, 13-hidroxi-LSD, 14-hidroxi-LSD, N-desetil-LSD, N-etil-N-(2-hidroxi-etil)- LSD (amida N), N-etil-N-vinil-LSD (amida N) y ácido lisérgico. Los metabolitos principales son nor-LSD 3 y 2-oxo- 3-hidroxi LSD 4, el último de los cuales solo se detecta recientemente en la orina humana omitida por la prueba de fármaco, su identidad se ha confirmado al comparar las características de LC-MS con un compuesto de referencia. La concentración promedio de 2-oxo-3-hidroxi-LSD 4 es 20 veces más que de LSD. En análisis de rutina de la orina humana, también se detecta d-iso-LSD 2. Este compuesto se considera que es un subproducto de la preparación ilícita de LSD.

25 Debido a la muy baja dosis consumida (usualmente 40 a 120µg) y debido al metabolismo rápido con menos de 1% excretado sin cambio en la orina, la identificación del LSD en las muestras biológicas es una exposición principal para los científicos forenses. Adicionalmente, la inestabilidad de LSD en ácido, el calor y la luz ha hecho su identificación aún más expuesta. Debido a que el LSD se metaboliza en un número de compuestos, los métodos más conocidos tienen por objeto identificar el LSD sin cambio (o progenitor) en las muestras biológicas.

30 Aunque el LSD se detecta más comúnmente en la orina mediante inmunoensayos, GC-MS, particularmente inmunoensayos de unión competitiva, sería el método de detección más simple y que ahorra más tiempo disponible. Los inmunoensayos de unión competitivos, como su nombre indica, mide la competición en la unión al anticuerpo entre una cantidad fija de antígeno marcado, el 'reactivo de detección' (o conjugado), y una cantidad desconocida de antígeno no marcado, la 'muestra'.

35 Los métodos de inmunoensayo comerciales para LSD incluyen procedimientos de radioinmunoensayo que son muy sensibles, pero que requieren trazadores de radionuclida, por ejemplo <sup>125</sup>I y <sup>3</sup>H, y, en algunos casos, una etapa de extracción preliminar. Para la prueba de fármaco en orina mediante radioinmunoensayo, se identifican muestras como positivas o negativas al comparar los conteos con aquellos de un estándar de corte que contiene 500pg/ml de LSD.

40 Los inmunoensayos homogéneos no isotópicos para LSD también están disponibles comercialmente. El Inmunoensayo de Donante de Enzima Clonada (CEDIA, Boehringer Mannheim) y el Inmunoensayo Multiplicado de Enzima (EMIT, Behring Diagnostics) se basan en el principio de activación de enzima. El Inmunoensayo en Línea (Roche Diagnostic Systems) se basa en la interacción cinética de las micropartículas en la solución. Estos tres ensayos se diseñan específicamente para análisis a gran escala o analizadores automáticos. El Inmunoensayo de Microplaca (STC Diagnostics) está disponible para prueba a escala pequeña. Estos inmunoensayos LSD no isotópicos se correlacionan bien con los radioinmunoensayos LSD originales.

Todos los métodos de inmunoensayo LSD disponibles comercialmente actualmente son específicos para el fármaco progenitor, LSD, y exhiben generalmente baja reactividad cruzada con metabolitos LSD.

5 Por ejemplo, la US 6,207,396 B1 (Microgenics Corporation) describe haptenos que son derivados del fármaco progenitor LSD (no 2-oxo-3-hidroxi-LSD), a través de la posición N-1 del anillo indol. Los anticuerpos de US 6,207,396 B1 son específicos para d-LSD y no reaccionan cruzadamente bien con 2-oxo-3-hidroxi-LSD (1.82%) o con iso-LSD (0.04%) (ver Tabla 1).

10 El examen de la técnica anterior falla en revelar un anticuerpo específico para 2-oxo-3-hidroxi LSD. La EP 1 148 339 A2 (Roche Diagnostics Corporation) describe haptenos derivados en la posición N-1, del anillo indol de 2-oxo-3-hidroxi-LSD o de 2-oxo-LSD. Los anticuerpos obtenidos en la EP 1 148 339 A2 exhiben altos niveles de reactividad cruzada, cuando se compara con 2-oxo-3-hidroxi-LSD, para el LSD de fármaco progenitor (74.9-84.4%) y baja reactividad cruzada para el segundo metabolito, nor-LSD (1.8-4.6%) (párrafo 71).

15 La EP 0 816 364 A1 (F. Hoffmann-La-Roche AG) y Bioconjugate Chemistry 1997, 8, pp896-905 cada uno describe la preparación de haptenos en la posición N-1 del anillo indol LSD en sí mismo o de no LSD. Bioconjugate Chemistry 1997, 8, 896-905 describe que anticuerpos generados por inmunógeno 4 exhiben 100% de reactividad cruzada con d-LSD, 20% de reactividad cruzada con nor-LSD y 50% de reactividad cruzada con 2-oxo-3-hidroxi-LSD. Los anticuerpos generados para el inmunógeno 8 exhiben 100% de reactividad cruzada con LSD, 40% de reactividad cruzada con nor-LSD y <20% de reactividad cruzada con 2-oxo-3-hidroxi-LSD.

20 Clin. Chem. 23/2, 169-174 (1977) describe un radioinmunoensayo para LSD en suero y orina, empleando antisuero para dos inmunógenos diferentes, en los cuales el LSD en sí mismo se deriva en el átomo de nitrógeno indol o por medio del nitrógeno de 8 $\beta$ -carboxamida.

Los actuales inventores no saben de algún derivado de haptenos con un reticulador en el nitrógeno de 8 $\beta$ -carboxamida de 2-oxo-3-hidroxi-LSD.

Los actuales inventores también no saben de anticuerpos específicos para 2-oxo-3-hidroxi-LSD pero carecen de reactividad cruzada significativa para el LSD progenitor en sí mismo o ni para el LSD.

25 **Objetos de la Invención:**

Es un objeto de la invención superar algunas o todas las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa de las mismas.

Es un objeto de una realización preferida de la invención proporcionar un método y un equipo para detectar, o determinar la cantidad de, 2-oxo-3-hidroxi-LSD.

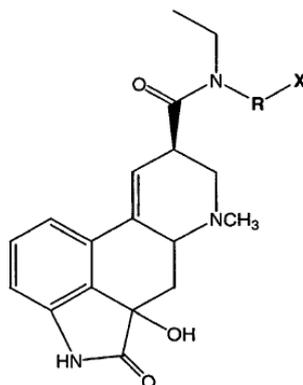
30 El objetivo de la presente invención es superar la carencia de los problemas específicos asociados con inmunoensayos conocidos para los metabolitos LSD, al preparar un anticuerpo altamente específico para 2-oxo-3-hidroxi-LSD, que no significará reacción cruzada con el LSD progenitor o nor LSD. "No significativamente" significa una reactividad cruzada de menos de aproximadamente 25%, preferiblemente menos de aproximadamente 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente 7.5%, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 5% cuando se compara con 100% para 2-oxo-3-hidroxi-LSD. Con el fin de alcanzar tal especificidad, los haptenos descritos en la presente invención se generan mediante derivación en el nitrógeno del 8 $\beta$ -carboxamida de 2-oxo-3-hidroxi-LSD.

35 Es un objeto adicional de una realización preferida de la presente invención para desarrollar anticuerpos capaces de unir con por lo menos el epítipo estructural 3-hidroxi-2-pirrolidona de 2-oxo-3-hidroxi-LSD.

40 **Descripción Detallada de la Invención**

La presente invención describe un hapteno derivado con un reticulador, en el nitrógeno de 8 $\beta$ -carboxamida o en N-6, de 2-oxo-3-hidroxi-LSD (Figura 1, 4).

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un hapteno de la siguiente fórmula estructural:-



En la que R es un enlace bivalente y X es un grupo terminal.

- 5 Preferiblemente, R comprende un grupo funcional alquileo, saturado o insaturado, de cadena recta o ramificada, sustituido o no sustituido, grupo funcional cicloalquileo, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido o un grupo funcional arileno, sustituido o no sustituido; y X comprende independientemente un ácido carboxílico o un éster del mismo, un aldehído, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo, preferiblemente tioacetilo, o un ácido halocarboxílico o un éster del mismo, preferiblemente haloacetilo.

Así, en la Fórmula estructural mencionada anteriormente, el reticulador comprende -R-X.

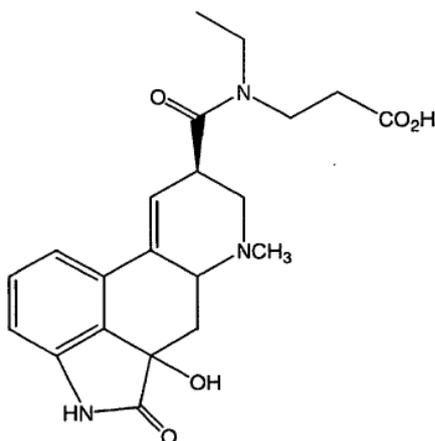
- 10 Más preferiblemente, R es C<sub>1-6</sub>, más preferiblemente un grupo funcional alquileo saturado, de cadena recta, sustituido o no sustituido C<sub>2-3</sub>.

Los grupos funcionales cicloalquileo adecuados incluyen ciclohexano.

Los grupos funcionales arileno adecuados incluyen benceno y xileno.

Ventajosamente, X es ácido carboxílico.

Más preferiblemente, el hapteno es el siguiente derivado de hapteno de 2-oxo-3-hidroxi-LSD:



15

Hapteno A

En el Hapteno A de la presente invención, R es un grupo alquileo de cadena recta no sustituido, saturado que tiene 2 átomos de carbono. En el Hapteno B, que se describe aquí, R es un grupo alquileo de cadena recta, no sustituido, saturado que tiene 3 átomos de carbono.

- 20 Los grupos terminales X se utilizan para acoplar los haptenos de la presente invención para llevar materiales para la preparación de los inmunógenos correspondientes. Los inmunógenos resultantes se pueden administrar a los

anfitriones para provocar la producción de antisuero específico ávido, preferiblemente antisuero policlonal, que luego se utilizan para desarrollar inmunoensayos sensibles para la detección de 2-oxo-3-hidroxi-LSD.

5 La invención, por lo tanto, también proporciona un inmunógeno que comprende un hapteno de acuerdo con la presente invención, acoplado a 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 un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con anticuerpos elevados contra el inmunógeno de la presente invención, los anticuerpos son capaces de unirse con por lo menos el epítipo estructural 3-hidroxi-2-pirrolidona de 2-oxo-3-hidroxi-LSD. Preferiblemente, los anticuerpos se fijan en un sustrato de respaldo. Preferiblemente, los anticuerpos son policlonales. Alternativamente, los anticuerpos son monoclonales.

10 En todavía un aspecto adicional, la presente invención comprende un conjugado que comprende el hapteno de la presente invención unido covalentemente a un agente de marca detectable. Preferiblemente, el agente de marca se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva, o una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el agente de marca es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, más preferiblemente peroxidasa de rábano (HRP). Alternativamente, o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente.

15 La invención proporciona adicionalmente un proceso para preparar los anticuerpos, el proceso que comprende las etapas de inmunizar un animal, preferiblemente un animal vertebrado, más preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno de acuerdo con la presente invención, y recolectar el suero resultante del animal inmunizado. Preferiblemente, el proceso comprende adicionalmente fijar dichos anticuerpos de suero a un sustrato de respaldo, preferiblemente un soporte sólido, más preferiblemente un soporte sólido de poliestireno. Los anticuerpos preparados de acuerdo con este proceso son policlonales.

20 En un aspecto adicional, la presente invención comprende un método para detectar o determinar 2-oxo-3-hidroxi-LSD en una muestra, el método que comprende 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 los mismos; detectar o determinar el conjugado vinculado; y deducir a partir de una curva de calibración la presencia de, o la cantidad de, 2-oxo-3-hidroxi-LSD en la muestra.

25 En todavía un aspecto adicional, la invención incluye un equipo para detectar o determinar 2-oxo-3-hidroxi-LSD, el equipo incluye el conjugado de la presente invención, o una mezcla de los mismos; y los anticuerpos de la presente invención, o una mezcla de los mismos. El equipo puede incluir opcionalmente instrucciones para el uso de dichos conjugados y dichos anticuerpos para detectar o determinar 2-oxo-3-hidroxi-LSD en una muestra.

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

En el método y equipo de la presente invención, se prefiere que sean diferentes los reticuladores respectivos (del inmunógeno y el conjugado).

35 En un aspecto adicional, la presente invención involucra el uso de los conjugados de acuerdo con la presente invención, o una mezcla de los mismos, con los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, o una mezcla de los mismos, para detectar o determinar 2-oxo-3-hidroxi-LSD en muestras tal como fluidos biológicos.

40 El foco de la presente invención es la preparación de anticuerpos específicos para 2-oxo-3-hidroxi-LSD (Figura 1, 4). Con el fin de alcanzar tal especificidad, el hapteno A se genera mediante la derivación de 2-oxo-3-hidroxi-LSD en la N-carboxamida.

#### Preparación de Haptenos

45 El hapteno A de la presente invención se prepara en tres etapas de ácido lisérgico (ver Figura 2 de los dibujos acompañantes). El grupo carboxílico de ácido lisérgico 5 se activa con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) en dimetilformamida (DMF). El intermedio de éster activado obtenido se hace reaccionar con N-etil N-(2-carbetoxi)etilamina 10 (preparado mediante la reacción de etilamina con acrilato de etilo) para producir el éster 6. La oxidación del enlace doble del anillo indol de la sal de tartrato del éster 6 con hipoclorito de calcio, generado in situ mediante la acción de gas de cloro en hidróxido de calcio, produce el éster 2-oxo-3-hidroxi de ácido lisérgico N-etil N-(2-carbetoxi)etil amida 7. El hapteno A se obtiene después de la saponificación del éster 7 mediante hidróxido de potasio acuoso en tetrahidrofurano.

5 El hapteno B, que se describe aquí, se prepara en tres etapas de nor-LSD 3 (ver Figura 3 de los dibujos acompañantes). La N-alkilación de nor-LSD 3 con etil 4-bromobutirato en la presencia de hidruro de sodio en DMF produce el éster 8. La oxidación del enlace doble del anillo indol del éster 8 se desarrolla utilizando las mismas condiciones utilizadas para la oxidación del éster 6, para producir el éster 2-oxo-3-hidroxi-6-(3-carboetoxi)propil-nor-LSD 9. El hapteno B se obtiene después de la saponificación de 9 utilizando hidróxido de potasio acuoso en tetrahidrofurano.

#### Preparación de Inmunógenos y Conjugados

10 Aunque los haptenos de la presente invención proporcionan los epítopos estructurales definidos, ellos no son en sí mismos inmunogénicos y por lo tanto necesitan ser conjugados con un material portador que provocará una respuesta inmunogénica cuando se administra a un animal anfitrión. Los materiales portadores adecuados contienen comúnmente segmentos de poli(aminoácido) e incluyen polipéptidos, proteínas tal como albúminas, proteínas de suero por ejemplo globulinas y proteínas del lente ocular y lipoproteínas. Los materiales de portador de proteína ilustrativos incluyen albúmina de suero bovino (BSA), ovalbúmina de huevo, globulina gama bovina, globulina de unión a tiroxina, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) etc. Alternativamente, se pueden emplear los 15 poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amina disponibles tal como lisina, como muchos otros materiales poliméricos o sintéticos que llevan grupos funcionales reactivos. En particular, se pueden conjugar los carbohidratos, levaduras o polisacáridos con los haptenos de la presente invención para producir inmunógenos de la presente invención.

20 Cada hapteno de la presente invención también se puede acoplar a un agente de marca tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano), una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o una marcada radioactiva 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.

25 Al preparar inmunógenos o conjugados con haptenos de la presente invención en donde está presente un grupo tiol, es decir, en donde X es un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo, grupos maleimida, halo o vinilsulfona primero se pueden introducir en el material portador o el agente de marca (enzima o marca) utilizando ligadores heterobifuncionales tal como: N-( $\gamma$ -maleimidobutiriloxi) éster succinimida (GMBS); succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC); (m-maleimidobenzoil)- N-hidroxisuccinimida (MBS); succinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato (SMPB); N-succinimidil(4-yodoacetil) aminobenzoato (SIAB); bromoacetilglicina N-hidroxisuccinimida; N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP); o vinilsulfona (Pierce Chemical Company, USA). El material portador así modificado o el agente de marca luego se puede conjugar por medio de los grupos tiol 30 en el hapteno. Para haptenos sin un grupo tiol presente, tal como hapteno A de la presente invención, se desarrolla conjugación sin modificación anterior del material portador o agente de marca utilizando métodos estándar de conjugación tal como anhídrido mezclado, EDC o activación de succinimidilo del hapteno.

35 Con el fin de confirmar que se ha alcanzado la conjugación adecuada del hapteno con el material portador, antes de la inmunización, se evalúa cada inmunógeno utilizando espectroscopia de masa de tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser UV asistido por matriz (MALDI-TOF MS). En el caso del material portador preferido, la albúmina de suero bovino, se prefiere un mínimo de 6 moléculas de hapteno por molécula portadora. Cada uno de los inmunógenos de la presente invención se puede utilizar para inmunización, con el fin de producir los anticuerpos de la presente invención.

40 Procedimiento General para Análisis MALDI-TOF de Inmunógenos.

45 La espectrometría de masa MALDI-TOF se desarrolla utilizando un espectrómetro de masa de desorción de láser de la Estación De Investigación de Bioespectrometría Voyager STR acoplado con extracción retrasada. Una alícuota de cada muestra a ser analizada se diluye en ácido trifluoroacético acuoso al 0.1% (TFA) para crear soluciones de muestra 1mg/ml. Se analizan alícuotas (1 $\mu$ l) utilizando una matriz de ácido Sinapínico y se utiliza la albúmina de suero bovino (Fluka) como un calibrador externo. La Figura 5 de los dibujos acompañantes muestra el análisis para el material portador BSA. Como se verá, está presente una señal principal que indica una masa protonada promedio para esta muestra de m/z 66,400. La señal a m/z 33,202 es consistente con el componente principal en una forma de doble carga.

#### Preparación de Antisuero

50 Con el fin de generar antisuero policlonal, cada inmunógeno de la presente invención se mezcla con adyuvante de Freund y la mezcla se inyecta dentro de un animal anfitrión, tal como un conejo, oveja, ratón, conejillo de indias o caballo. Se colocan inyecciones adicionales (refuerzos) y se toma una muestra de suero para la evaluación del título de anticuerpo. Cuando se ha alcanzado el título óptimo, el animal anfitrión luego se mezcla para producir un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de anticuerpo requerido depende de la 55 aplicación pretendida. Para muchos propósitos, no existe requerimiento en toda la purificación, sin embargo, en

otros casos, tal como en donde se inmoviliza el anticuerpo en un soporte sólido, las etapas de purificación se pueden tomar para remover el material indeseado y eliminar la unión no específica.

Los anticuerpos específicos de la presente invención son útiles como reactivos en los ensayos bioquímicos para la detección o determinación de 2-oxo-3-hidroxi-LSD en los fluidos biológicos.

- 5 En los siguientes Ejemplos, los porcentajes se toman como porcentajes (volumen/volumen), a menos que se especifique otra cosa.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Síntesis de ligador 10 N-etil N-(2-carbetoxi)etilamina

- 10 A 110 ml de una solución al 2M de etilamina en tetrahidrofurano (THF) a 0°C se agrega en forma de gotas acrilato de etilo (8.0ml, 73.92mmol) en 40ml de tetrahidrofurano (THF). La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se filtra a través de una almohadilla lana de algodón y se concentra bajo presión reducida para producir el compuesto del título 10 (9.01g, 84%) como un líquido claro.

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3319.68, 2969.10, 1732.07, 1191.87 (FT-IR: Figura 8)

### Ejemplo 2: Síntesis de ácido lisérgico N-etil N-(2-carbetoxi)etil amida 6

- 15 Una mezcla de ácido lisérgico 5 (934mg, 3.27mmol) en 40ml de dimetilformamida seca (DMF) se trata con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI, 795mg, 4.91mmol) y se agita bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 1 hora. El ligador N-etil N-(2-carbetoxi)etilamina 10 (1.90g, 13.08mmol) en 10ml de dimetilformamida seca (DMF) se agrega en forma de gotas y la solución de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se concentra bajo presión reducida y el residuo resultante se disuelve en 200ml de cloroformo. La solución de cloroformo se lava dos veces con 100ml de agua, se seca sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentra bajo presión reducida para producir el compuesto del título crudo 6 (2.2g) como un aceite. Este se utiliza sin purificación adicional en el siguiente Ejemplo.

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3121.90, 2987.10, 2848.65, 1735.30, 1676.97, 1202.97 (FT-IR : Figura 9)

### Ejemplo 3: Síntesis de 2-oxo-3-hidroxi de ácido lisérgico N-etil N-(2-carbetoxi)etil amida 7

- 25 A una mezcla de ácido tartárico (2.52g, 16.79mmol) se disuelve en 40ml de agua y se enfría en hielo, se agrega 2.2g de ácido lisérgico N-etil N-(2-carbetoxi)etil amida crudo 6 (1.29g, 3.27mmol; con base en 100% de rendimiento del Ejemplo previo). Se prepara una solución de hipoclorito de calcio al disolver gas de cloro (1.55g, 21.83mmol) dentro de una solución de hidróxido de calcio (0.81g, 10.93mmol) en 240ml de agua. La solución nubosa se pasa a través de un filtro de membrana de a 0.45 $\mu\text{M}$ , para remover cualquier material no disuelto, y se enfría en hielo. A 170ml de esta solución de hipoclorito de calcio frescamente preparada se agrega la solución de tartrato de ácido lisérgico N-etil N-(2-carbetoxi)etil amida. La reacción se agita a 0°C-5°C durante 30 min. La mezcla de reacción se diluye con 80ml de solución de bicarbonato de sodio saturada y se extrae con 6x100ml de cloroformo. Los extractos de cloroformo se combinan, se secan sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentran bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografía sobre gel de sílice para dar 2-oxo-3-hidroxi de ácido lisérgico N-etil N-(2-carbetoxi)etil amida 7 (385mg, 28%) como un sólido café oscuro amorfo ( $R_f$  0.53 sobre sílice utilizando 25% de metanol en cloroformo como el eluyente).

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3180.04, 2980.66, 2937.48, 2803.85, 1731.59, 1669.11, 1448.37, 1385.34 (FT-IR : Figura 10)

### Ejemplo 4: Síntesis de 2-oxo-3-hidroxi de ácido lisérgico N-etil N-(2-carboxi)etil amida (Hapteno A)

- 40 A una mezcla de 2-oxo-3-hidroxi de ácido lisérgico N-etil N-(2-carbetoxi)etil amida 7 (63.6mg, 0.15mmol) en 5ml de tetrahidrofurano (THF) y 5ml de agua se agrega hidróxido de potasio sólido (12.5mg, 0.22mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas (h) hasta que se completa la reacción mediante análisis TLC. La solución de reacción se neutraliza a pH 7 utilizando 1N de HCl y se concentra hasta secado bajo presión reducida. El residuo se disuelve en una mezcla al 10% de metanol en cloroformo y las sales inorgánicas se remueven mediante filtración. La evaporación de los disolventes produce 2-oxo-3-hidroxi de ácido lisérgico N-etil N-(2-carboxi)etil amida (Hapteno A) (45mg, 76%) como un sólido café amorfo ( $R_f$  0.52 sobre sílice utilizando 20% de metanol en cloroformo como el eluyente).

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3297, 2963, 1723, 1557, 1099, 1020, 802 (FT-IR)

**Ejemplo 5:** Conjugación de 2-oxo-3-hidroxi de ácido lisérgico N-etil N-(2-carboxi)etilamida en BSA (Inmunógeno A)

5 A una solución de 2-oxo-3-hidroxi de ácido lisérgico N-etil N-(2-carboxi)etil amida (Hapteno A), (45mg, 0.11mmol) en 1ml de dimetilforamida (DMF) se agrega dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (27.9mg, 0.14mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (15.6mg, 0.14mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La dicitclohexilurea formada se filtra y la solución se agrega en forma de gotas a una solución de BSA (150mg) en 6ml de solución de bicarbonato de sodio al 0.05M (pH 8.5). La mezcla se agita durante la noche a 4°C, se protege de la luz. La solución luego se dializa durante la noche contra 5L de PBS (pH 7.2) a 4°C y se seca por congelamiento.

10 Mediante MALDI-TOF (Ver Figura 6 de los dibujos acompañantes), está presente una señal principal que indica una masa protonada promedio para esta muestra de m/z 70,351. La señal a m/z 35,248 es consistente con el componente principal en una forma de doble carga. Estos datos sugieren que un promedio de 9.8 moléculas de Hapteno A se han conjugado por molécula de BSA.

**Ejemplo 6:** Síntesis de 6-ciano-nor-LSD

15 A una solución en reflujo de bromuro de cianógeno (2.96g, 27.95mmol) en 150ml de cloroformo seco, bajo nitrógeno, se agrega en forma de gotas una solución de dietilamida de ácido lisérgico 1 (2.00g, 6.19mmol) en 100ml de cloroformo seco. La reacción se calienta bajo reflujo durante 4 horas y se enfría a temperatura ambiente. La fase orgánica se extrae dos veces con 150ml de 1% (p/v) de solución de ácido tartárico. Los lavados acuosos combinados se extraen con 100ml de cloroformo y las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentran bajo presión reducida. El residuo negro se cromatografía sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo para producir 6-ciano-nor-LSD (879mg, 42%) como un sólido amarillo pálido después de la evaporación del disolvente.

20  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3192, 2933, 2212, 1636, 1449, 986

**Ejemplo 7:** Síntesis de nor-LSD 3

25 Una mezcla de 6-ciano-nor-LSD (879mg, 2.63mmol) en 8ml de ácido acético y 2ml de agua, bajo nitrógeno, se trata con polvo de zinc (1.53g, 23.39mmol) y se calienta bajo reflujo durante 6h. La solución se le permite enfriar y se decanta a partir del exceso de zinc con un lavado de agua. La solución de reacción se concentra en un volumen pequeño bajo presión reducida y el concentrado se diluye con 10ml de agua. El pH de la solución se toma a pH 9 utilizando solución de amoniaco concentrado a 0°C. El precipitado gomoso resultante se extrae cuatro veces con 50ml de cloroformo. Los extractos de cloroformo combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro y se concentran bajo presión reducida para producir nor- LSD 3 (625mg, 77%) como un sólido amorfo café claro ( $R_f$  0.47 sobre sílice utilizando 20% de metanol en cloroformo como el eluyente).

30  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3260, 2974, 2934, 1620, 1447

**Ejemplo 8:** Síntesis de 6-(3-carboetoxi)propil-nor-LSD 8

35 Una mezcla de nor-LSD 3 (625mg, 2.02mmol) en 5ml de dimetilformamida seca (DMF), se trata con bromobutirato de etilo (290PL, 2.02mmol), carbonato de potasio (839mg, 6.06mmol) y una cantidad catalítica de yoduro de potasio, y se agita bajo nitrógeno a 40°C durante la noche. La solución de reacción se concentra en un residuo bajo presión reducida y se cromatografía sobre gel de sílice utilizando 5% de metanol en cloroformo para producir 6-(3-carboetoxi)propil-nor-LSD 8 (368mg, 43%) después de la evaporación de los disolventes ( $R_f$  0.77 sobre sílice utilizando 20% de metanol en cloroformo como el eluyente).

40  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3268.56, 2975.19, 2934.49, 1731.00, 1623.51 (FT-IR : Figura 11)

**Ejemplo 9:** Síntesis de 2-oxo-3-hidroxi-6-(3-carboetoxi)propil-nor-LSD 9

45 A una mezcla de ácido tartárico (196mg, 1.31mmol) se disuelve en 20ml de agua, se enfría en hielo, se agrega 6-(3-carboetoxi)propil-nor-LSD 8 (368mg, 0.87mmol). Una solución de hipoclorito de calcio se prepara al disolver gas de cloro (1.55g, 21.83mmol) dentro de una solución de hidróxido de calcio (0.81g, 10.93mmol) en 240ml de agua. La solución nubosa se pasa a través de un filtro de membrana de 0.45µM, para remover cualquier material no disuelto, y se enfría en hielo. A 45ml de la solución de hipoclorito de calcio frescamente preparada se agrega la solución de tartrato de 6-carboetoxipropildietilamida de ácido lisérgico y la reacción se agita a 0°C-5°C durante 30 min. La reacción se diluye con 80ml de solución de bicarbonato de sodio saturada y se extrae con 6x100ml de cloroformo. Los extractos de cloroformo se combinan, se secan sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentran bajo presión reducida. El residuo resultante se cromatografía sobre gel de sílice para dar 2-oxo-3-hidroxi-6-(3-carboetoxi)propil-

nor-LSD 9 (102mg, 26%) como un sólido café ( $R_f$  0.44 sobre sílice utilizando 10% de metanol en cloroformo como el eluyente).

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3242.29, 2976.74, 1727.98, 1615.25, 1447.09, 1214.64 (FT-IR : Figura 12)

**Ejemplo 10:** Síntesis de 2-oxo-3-hidroxi-6-(3-carboxi)propil-nor-LSD (Hapteno B)

- 5 A una mezcla de 2-oxo-3-hidroxi-6-(3-carboetoxi)propil-nor-LSD 9 (90mg, 0.20mmol) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF) y 3 ml de agua se agrega hidróxido de potasio sólido (22mg, 0.40mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3h hasta que se completa la reacción mediante análisis TLC. La solución de reacción se neutraliza a pH 7 utilizando 1N de HCl y se concentra hasta secado bajo presión reducida. El residuo se disuelve en una mezcla al 10% de metanol en cloroformo y las sales inorgánicas se remueven mediante filtración. La evaporación de los disolventes produce 2-oxo-3-hidroxi-6-(3- carboxi)propil-nor-LSD (Hapteno B), (86mg, 102%) como un sólido café espumoso.

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3242.47, 2979.73, 1720.79, 1605.03 (FT-IR : Figura 13)

**Ejemplo 11:** Conjugación de 2-oxo-3-hidroxi-6-(3-carboxi)propil-nor-LSD en BSA (Inmunógeno B)

- 15 A una solución de 2-oxo-3-hidroxi-6-(3-carboxi)propil-nor-LSD (Hapteno B) (32mg, 0.08mmol) en 0.5ml de dimetilforamida (DMF) se agrega diciclohexilcarbodiimida (DCC) (18.5mg, 0.09mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (10.4mg, 0.09mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La diciclohexilurea formada se remueve mediante filtración. La solución obtenida se agrega en forma de gotas a una solución de BSA (100mg) en 6ml de solución de bicarbonato de sodio al 0.05M (pH 8.5). La mezcla luego se agita durante la noche a 4°C se protege de la luz. La solución se dializa contra 5L de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) (pH 7.2) a 4°C durante 24 horas (2 cambios) y luego se seca por congelamiento.

20 Mediante MALDI-TOF (ver Figura 7 de los dibujos acompañantes), una señal principal está presente que indica una masa protonada promedio para esta muestra de  $m/z$  69,699. La señal a  $m/z$  34,862 es consistente con el componente principal en una forma de doble carga. Estos datos sugieren que un promedio de 8.1 moléculas de Hapteno B se han conjugado por molécula de BSA.

- 25 **Ejemplo 12:** Conjugación de Hapteno A al Agente de Marca (Peroxidasa de Rábano (HRP))

- Se disuelve 10mg de EDC en 800 $\mu$ l de agua y se agrega inmediatamente a una solución del hapteno (1mg) en 200 $\mu$ l de DMF. La solución resultante se mezcla gentilmente y luego se agrega a una solución de HRP (20mg) en 1ml de agua. Después de mezclar, se agrega 5mg de sulfo-NHS y la mezcla de reacción completa se incuba durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. El conjugado resultante se purifica mediante el pasaje a través de dos columnas PD10 (Pharmacia Biotech), se eluyen con 20mM de PBS, pH 7.2, y luego se dializa durante la noche a 4°C contra 20mM de PBS, pH7.2.

**Ejemplo 13:** Preparación de anticuerpos en Inmunógeno A, preparados en el Ejemplo 5.

- 35 Una solución acuosa del inmunógeno preparado en el Ejemplo 5 se formula con Adyuvante Completo de Freund (FCA) para formar una emulsión que consiste de 4mg/ml de inmunógeno en 50% (v/v) de FCA. Se inmunizan tres ovejas con esta emulsión (1ra inmunización), se inyectan subcutáneamente 0.25ml en cada uno de los cuatro sitios en el flanco de cada animal. La siguiente inmunización (Inoculación 1) contiene 2mg/ml de inmunógeno y las inmunizaciones posteriores (2 a 25 refuerzos) contienen 1mg/ml. Todas las refuerzos se emulsifican en 50% (v/v) de Adyuvante Incompleto de Freund (FIA) y se administran en la misma forma como la 1ra inmunización en intervalos mensuales durante 1 año. Se toma muestra de sangre 7 a 14 días después de cada inoculación. Cada muestra se procesa para producir antisuero que se purifica adicionalmente mediante ácido caprílico y precipitación de sulfato de amonio para producir una fracción de inmunoglobulina G (IgG). La fracción IgG se evalúa mediante ensayo de placa de microtítulo competitivo ELISA, como se describe en el Ejemplo 14 adelante.

**Ejemplo 14:** Desarrollo de un ELISA competitivo para 2-oxo-3-hidroxi-LSD

- 45 Los pozos de una placa de microtítulo de poliestireno de 96 pozos de unión mejorada se cubren con la fracción IgG del antisuero elevado a inmunógeno A (Ejemplo 5) de la presente invención, diluido en 10mM de Tris, pH 8.5 (125 $\mu$ l/pozo). Se determina la dilución de recubrimiento de anticuerpo apropiada utilizando técnicas de tablero ELISA estándar. La placa se incuba durante 2 horas a 37°C, se lava 4 veces con solución salina amortiguada con Tris que contiene Tween 20 (TBST) y se tapa seca. Las soluciones estándar de 2-oxo-3-hidroxi-LSD se preparan en TBST a 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000ng/ml y 50 $\mu$ l de cada uno se agrega a los pozos apropiados (Figura 4). El conjugado (reactivo de detección) de la presente invención se diluye en amortiguador Tris (pH 7.2) que contiene

EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA, la dilución apropiada se determina mediante técnicas de tablero ELISA estándar, y 75µl se agrega a los pozos apropiados (Figura 4). La placa se incuba a 37°C durante 2 horas. El exceso del conjugado vinculado se remueve mediante 6 veces de lavado durante un periodo de 10 minutos con TBST.

5 Se agrega 125µl de sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) a cada pozo de la placa, que luego se incuba durante 15 a 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se termina mediante la adición de 125µl de 0.2M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a cada pozo. La absorbancia luego se mide a 450nm utilizando un lector de placa de microtítulo. Los datos generados en este ensayo se presentan en la Tabla 1 adelante.

**Ejemplo 15:** Reactividad cruzada del ELISA competitivo 2-oxo-3-hidroxi-LSD con LSD y sus metabolitos

10 Las soluciones estándar LSD y sus metabolitos se preparan en TBST a 0, 10.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0, 1000 y 2000 ng/ml. Empleando cada serie de estándares en el presente ELISA competitivo, se generan curvas de calibración y estas se utilizan para determinar la reactividad cruzada de los inmunoensayos con LSD y sus metabolitos, se calcula la reactividad cruzada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%CR = IC50_{2-oxo} / IC50_{LSD} \times 100$$

15 En donde %CR es el porcentaje de reactividad cruzada, IC<sub>50-2-oxo</sub> es la concentración de 2-oxo-3-hidroxi-LSD que origina 50% de desplazamiento de señal e IC<sub>50-LSD</sub> es la concentración del metabolito LSD o LSD que origina 50% de desplazamiento de señal.

Tabla 1: Datos de reactividad cruzada generados del ensayo de placa de microtítulo competitivo para el 2-oxo-3-hidroxi-LSD que emplea antisuero elevado a inmunógeno A (hapteno A-BSA) (Ejemplo 5) y conjugado A (hapteno A-HRP) como el reactivo de detección (Ejemplo 12).

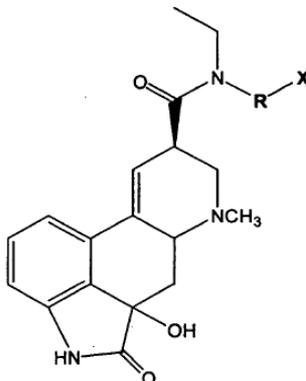
Estándar ng/ml	2-Oxo-3-Hidroxi-LSD		Nor LSD		LSD	
	A450	%B/B0	A450	%B/B0	A450	%B/B0
0	1.779		1.790		1.805	
10	1.396	78.47	1.772	99.0	1.792	99.28
50	1.056	59.36	1.767	98.7	1.777	98.45
100	0.891	50.08	1.763	98.5	1.775	98.34
250	0.660	37.10	1.738	97.1	1.740	96.40
500	0.514	28.89	1.686	94.2	1.653	91.58
1000	0.391	21.98	1.638	91.5	1.572	87.09
2000	0.318	17.88	1.552	86.7	1.453	80.50

A<sub>450</sub> = absorbancia a 450nm  
 B = absorbancia a 450nm en xng/ml de concentración estándar  
 B0 = absorbancia a 450nm en 0ng/ml de concentración estándar  
 % CR = porcentaje de reactividad cruzada con base en especificidad a 2-oxo-3-hidroxi

20 Es evidente a partir de los resultados que el presente ensayo es altamente específico para 2-oxo-3-hidroxi-LSD y exhibe muy bajos niveles de reactividad cruzada con LSD y nor LSD.

## REIVINDICACIONES

1. Un hapteno que tiene la siguiente Fórmula estructural:-



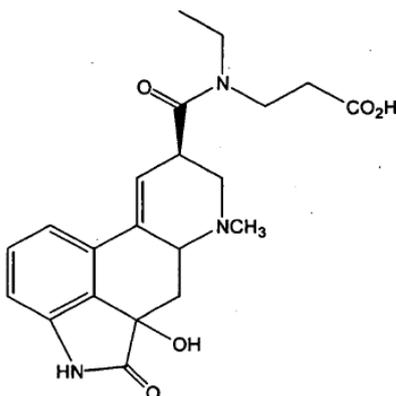
- 5 en la que R es un enlace bivalente y X es un grupo funcional para acoplar a un material portador que confiere antigenicidad o a un agente de marca detectable.

- 10 2. Un hapteno de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que R comprende un grupo funcional alquileo, saturado o insaturado, de cadena recta o ramificada, sustituido o no sustituido; grupo funcional cicloalquileo, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido; o un grupo funcional arileno, sustituido o no sustituido; y X comprende independientemente un ácido carboxílico o un éster del mismo, un aldehído, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo, preferiblemente tioacetilo, o un ácido halocarboxílico o un éster del mismo, preferiblemente haloacetilo.

3. Un hapteno de acuerdo con la Reivindicación 2, en la que R es un C<sub>1-6</sub>, más preferiblemente un grupo funcional alquileo saturado, de cadena recta, sustituido o no sustituido, C<sub>2-3</sub>.

4. Un hapteno de acuerdo con la Reivindicación 2 o 3, en la que X es ácido carboxílico.

- 15 5. Un hapteno de acuerdo con la Reivindicación 4, el hapteno tiene el siguiente derivado de hapteno de 2-oxo-3-hidroxi-LSD:



Hapteno A

- 20 6. Un hapteno de acuerdo con la Reivindicación 3, en la que R es un grupo alquileo de cadena recta no sustituido, saturado que tiene 2 átomos de carbono.

7. Un inmunógeno que comprende un hapteno de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en las que un material portador que confiere antigenicidad se acopla a X en el hapteno.

8. Anticuerpos elevados contra el inmunógeno de la Reivindicación 7, los anticuerpos son capaces de unirse con por lo menos el epítipo estructural 3-hidroxi-2-pirrolidona de 2-oxo-3-hidroxi-LSD y en donde el anticuerpo tiene una reactividad cruzada de menos de 25% para LSD y o LSD, cuando se compara con 100% para 2-oxo-3-hidroxi-LSD.
- 5 9. Un conjugado que comprende el hapteno de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en la que a agente de marca detectable se une covalentemente a X en el hapteno.
10. Un conjugado de acuerdo con la Reivindicación 9, en la que el agente de marca se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva, o una mezcla de los mismos.
- 10 11. Un proceso para preparar los anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 8, el proceso comprende las etapas de inmunizar un animal, preferiblemente un animal vertebrado, más preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno de acuerdo con la Reivindicación 7, y recolectar el suero resultante del animal inmunizado.
- 15 12. Un método para detectar o determinar 2-oxo-3-hidroxi-LSD en una muestra, el método comprende poner en contacto la muestra con el conjugado de la Reivindicación 9 o 10, o una mezcla de los mismos, y con los anticuerpos de la Reivindicación 8, o una mezcla de los mismos; detectar o determinar el conjugado vinculado; y deducir a partir de una curva de calibración la presencia de, o la cantidad de, 2-oxo-3-hidroxi-LSD en la muestra.
13. Un equipo para detectar o determinar 2-oxo-3-hidroxi-LSD, el equipo incluye el conjugado de la Reivindicación 9 o 10, o una mezcla de los mismos; y los anticuerpos de la Reivindicación 8, o una mezcla de los mismos.
- 20 14. Uso de los conjugados de acuerdo con la Reivindicación 9 o 10, o una mezcla de los mismos, con los anticuerpos de acuerdo con la Reivindicación 8, o una mezcla de los mismos, para detectar o determinar 2-oxo-3-hidroxi-LSD en muestras tal como fluidos biológicos.
- 25 15. Anticuerpos elevados contra el inmunógeno de la Reivindicación 7, que tienen especificidad para 2-oxo-3-hidroxi-LSD y que se caracterizan por tener reactividad cruzada de menos de 5% para LSD y o LSD, cuando se compara con 100% para 2-oxo-3-hidroxi-LSD.