

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 203**

51 Int. Cl.:
C07C 215/60 (2006.01)
C07C 213/02 (2006.01)
C07C 215/56 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05077582 .4**
96 Fecha de presentación: **10.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1657235**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2006**

54 Título: **HAPTENOS DERIVADOS DE FENETANOLAMINA, INMUNÓGENOS Y CONJUGADOS QUE LOS COMPRENDEN Y ANTICUERPOS QUE RECONOCEN DICHS INMUNÓGENOS Y CONJUGADOS.**

30 Prioridad:
10.11.2004 EP 04078100

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.02.2012

73 Titular/es:
**RANDOX LABORATORIES LTD.
ARDMORE, DIAMOND ROAD
CRUMLIN, COUNTY ANTRIM BT29 4QY, GB**

72 Inventor/es:
**McConnell, Robert Ivan;
Fitzgerald, Stephen Peter;
Benchikh, El Ouard y
Lowry, Andrew Philip**

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

ES 2 374 203 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 derivados de fenetanolamina, inmunógenos y conjugados que los comprenden y anticuerpos que reconocen dichos inmunógenos y conjugados

5 La presente invención se refiere a un método para preparar haptenos que son útiles para la preparación de inmunógenos, anticuerpos y conjugados, para el uso en inmunoensayos competitivos para la detección de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina.

La presente divulgación también se refiere a un método y un estuche para detectar o determinar fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina.

10 Por "detectar" se entiende analizar cualitativamente la presencia o ausencia de una sustancia. Por "determinar" se entiende analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia.

La ractopamina es un agente fenetanolamínico mejorador de la flaqueza recientemente aprobado como un aditivo alimentario para cerdos en los Estados Unidos. Puercos a los que se administra ractopamina en la dieta muestran velocidades de crecimiento y eficacias de alimentación incrementadas y una deposición de grasas disminuida, con relación a los animales no tratados.

15 Los β -agonistas de fenetanolamina tienen una historia de uso con propósitos no autorizados por productores de ganado que esperan mejorar la economía de la producción ganadera. El uso inapropiado de β -agonistas puede provocar un riesgo grave para la salud humana debido a los residuos que dejan en la carne y otros productos alimenticios de origen animal. En efecto, en Europa, todos los β -agonistas están prohibidos para el uso en ganado y para mejorar el rendimiento atlético bajo la Directiva de la UE 96/22/EC.

20 La presencia de residuos de fármaco en tejidos animales es un problema para la seguridad alimentaria, especialmente cuando el compuesto se ha usado ilegalmente o de un modo proscrito por los funcionarios reguladores (uso no autorizado). En un esfuerzo para combatir tal uso ilícito de compuestos β -agonistas, las organizaciones reguladoras en todo el mundo prueban tejidos animales y fluidos corporales con respecto a la presencia de tales fármacos ilícitos.

25 Se han usado ampliamente acciones de unión específicas, tales como interacciones anticuerpo-antígeno, en inmunoensayos para detectar una variedad de sustancias presentes en fluidos biológicos. Así, por ejemplo, podrían usarse radioinmunoensayos para la determinación de fenetanolaminas tales como ractopamina, isoxsuprina y ritodrina. Los radioinmunoensayos son muy sensibles pero no requieren trazadores radionucleotídicos. Los ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) son una alternativa no radiactiva que podría usarse para la
30 determinación cualitativa y cuantitativa de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina.

Haasnoot et ál. (The Analyst (1994), 119, "Determination of fenoterol and ractopamine in urine by enzyme immunoassay", 2675-2680) divulgan un inmunoensayo enzimático urinario para ractopamina. El anticuerpo de Haasnoot se derivaba de un derivado de fenoterol y mostraba 20% de reactividad cruzada con ractopamina, pero el
35 análisis de ractopamina no se correlacionaba bien con el análisis de GC-MS. Elliott et ál. (The Analyst (1998), 123, "Screening and confirmatory determination of ractopamine residues in calves treated with growth promoting doses of the β -agonist", 1103-1107) divulgan un inmunoensayo para residuos de ractopamina. El anticuerpo de Elliott, cuando se usaba en un inmunoensayo en el que las muestras se hidrolizaban enzimáticamente antes del análisis, se correlacionaba bien con LC-MS-MS pero, como con Haasnoot et ál., los anticuerpos se producían de un modo no
40 dirigido, contra un derivado de fenoterol.

Shelver y Smith (Journal of Immunoassay (2000), 21(1), "Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine", 1-23) divulgan la preparación de anticuerpos policlonales generados a partir de hemiglutarato de ractopamina-KLH. El hapteno se prepara mediante la reacción de ractopamina con anhídrido glutárico, seguido por conjugación con un material portador que confiere antigenicidad. El método empleado para sintetizar
45 hemiglutarato de ractopamina es incontrolado y dará como resultado la derivación de ractopamina en una cualquiera de las posiciones 1, 10, 10' y N. El anticuerpo de Shelver y Smith generado muestra una sensibilidad (IC_{50}) de 4,2 ng/ml hacia ractopamina. El anticuerpo también exhibe 33% de reactividad cruzada con dobutamina.

Shelver et ál. (J. Agric. Food Chem. 48 (2000), "Production and characterisation of a monoclonal antibody against the β -adrenergic agonist ractopamine", 4020-4026 y su Patente de EE. UU. N° 6.274.334) divulgan la generación de un anticuerpo monoclonal, en el que se usó glutarato de ractopamina-hemocianina de lapa de ojo de cerradura como el
50 antígeno para la generación de anticuerpo. El clon de anticuerpo seleccionado (5G10) muestra 5,3% de reactividad cruzada con dobutamina y 3,6% de reactividad cruzada con ritodrina.

Un anticuerpo policlonal se genera mediante inmunización repetida de un huésped mamífero no humano con el inmunógeno diana. El antisuero resultante se recoge y los anticuerpos se aíslan. Para generar un anticuerpo monoclonal, linfocitos procedentes de un animal inmunizado se fusionan con una línea celular de mieloma para producir células híbridas o hibridomas. Estos hibridomas pueden clonarse para la producción del anticuerpo monoclonal secretado. Un anticuerpo monoclonal reconocerá un solo epítipo, mientras que un antisuero policlonal puede reconocer varios epítopos en el mismo antígeno. De ahí que la tecnología de anticuerpos monoclonales pueda aplicarse habitualmente para generar un anticuerpo con más especificidad para el inmunógeno diana.

En la referencia de Shelver et ál. mencionada anteriormente, se ha usado un enfoque de 'pistola de dispersión' para generar anticuerpos policlonales para ractopamina. El método incontrolado usado para preparar el hapteno de ractopamina sugiere que el inmunógeno resultante está compuesto por una mezcla de ractopamina ligada a hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) en una cualquiera de las posiciones 1, 10, 10' y N. La inmunización con tal inmunógeno dará como resultado la generación de antisueros con una diversidad de especificidad. Esto se corrobora en los datos de reactividad cruzada presentados en la referencia de Shelver. Su anticuerpo policlonal reacciona cruzadamente 33% con dobutamina, mientras que su anticuerpo monoclonal reacciona cruzadamente 5,3% con dobutamina. En contraste, la introducción dirigida de un grupo reticulador sobre un solo grupo hidroxilo fenólico del hapteno diana, de acuerdo con la presente invención, produce un efecto sorprendente (un reticulador heterofuncional, según se define en la presente memoria, es una estructura que incorpora uno o más grupos funcionales que contienen uno o más heteroátomos, que se liga, por ejemplo, a través de unión covalente, con un sustrato (en este caso un hapteno), siendo además capaz el reticulador de ligarse a un péptido, un polipéptido o una proteína o un agente marcador detectable). Los anticuerpos generados para los presentes haptenos son altamente específicos y no reaccionan cruzadamente significativamente con dobutamina. En el caso de la ractopamina, el anticuerpo generado para el derivado en la posición 10 reacciona cruzadamente 0,186% con dobutamina, mientras que el anticuerpo generado para el derivado en la posición 10' exhibe una reactividad cruzada de <0,8% con dobutamina. La única explicación para la reactividad cruzada de los anticuerpos de Shelver con dobutamina es que Shelver et ál. han generado anticuerpos para ractopamina derivados en el hidroxilo en la posición 1 (grupo hidroxilo en la cadena alifática). Este grupo hidroxilo está ausente en la dobutamina. La presencia de un solo grupo hidroxilo en uno de los anillos aromáticos de los derivados de hapteno usados en la presente solicitud da como resultado un alto grado de especificidad para ractopamina, isoxsuprina y ritodrina. Los anticuerpos de la presente solicitud también son considerablemente más sensibles que los anticuerpos policlonales y monoclonales de Shelver. Para la ractopamina, el anticuerpo para el derivado en la posición 10 tiene una IC_{50} de 0,082 ng/ml, mientras que el anticuerpo para el derivado en la posición 10' tiene una IC_{50} de 0,202 ng/ml. Los presentes anticuerpos exhiben especificidad y sensibilidad mejoradas. La presente solicitud ilustra como puede generarse un anticuerpo superior usando tecnología de anticuerpos policlonales y el procedimiento de derivación dirigida.

Nada de la técnica anterior conocida por los inventores divulga ni sugiere preparar haptenos de fenetanolaminas tales como, pero no limitados a, haptenos de ractopamina, isoxsuprina o ritodrina mediante el método divulgado en la presente memoria. El presente método permite el acoplamiento controlado de un grupo de reticulación a un solo grupo hidroxilo fenólico del hapteno. La presente invención, al permitir la preparación de haptenos y, por lo tanto, inmunógenos derivados en un solo grupo hidroxilo fenólico, facilita la preparación de anticuerpos para inmunógenos derivados en un solo grupo hidroxilo fenólico. Nada de la técnica anterior divulga ni sugiere la derivación dirigida de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, análogos de ractopamina, isoxsuprina y ritodrina en un solo grupo hidroxilo fenólico. Tales haptenos también forman parte de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra las estructuras de ractopamina, ritodrina e isoxsuprina.

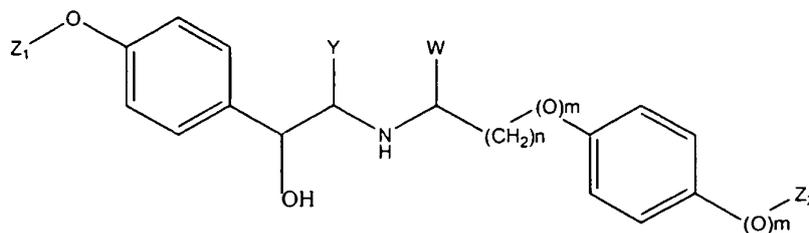
La Figura 2 muestra las estructuras de los Haptenos A, B, C, D y E.

Las Figuras 3-7 muestran esquemas de reacción para la preparación de los Haptenos/Inmunógenos A, B, C, D y E, respectivamente.

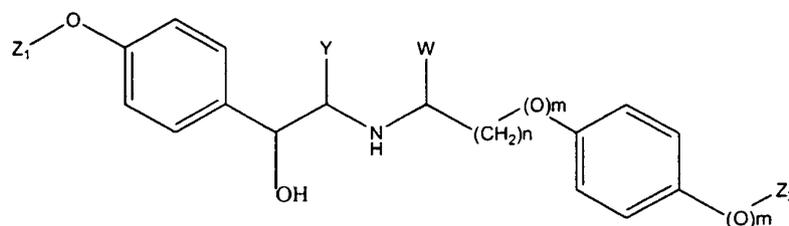
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación describe haptenos biaromáticos derivados con reticuladores en un solo grupo hidroxilo fenólico. Las estructuras de ractopamina, isoxsuprina y ritodrina se ilustran en la Figura 1.

La divulgación también proporciona un hapteno derivado con un reticulador en Z_1 , en el que el hapteno tiene la fórmula estructural I



en la que Z_1 es un reticulador y Z_2 es H; Y es independientemente H o CH_3 ; W es independientemente H o CH_3 ; n es independientemente 1 o 2; y m es independientemente 0 o 1. Adicionalmente, la invención proporciona un hapteno derivado con un reticulador en Z_2 , en el que el hapteno tiene la fórmula estructural II

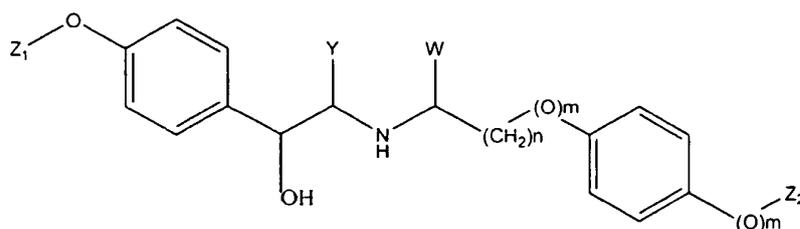


5

en la que Z_1 es H y Z_2 es un reticulador; Y es independientemente H o CH_3 ; W es independientemente H o CH_3 ; n es independientemente 1 o 2; y m es independientemente 0 o 1.

Más preferiblemente, los haptenos tienen las fórmulas estructurales A, B, C, D o E según se ilustra en la Figura 2.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para preparar un hapteno de fórmula I

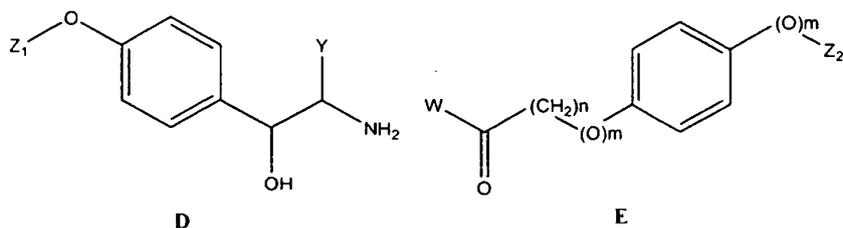


10

Hapteno I

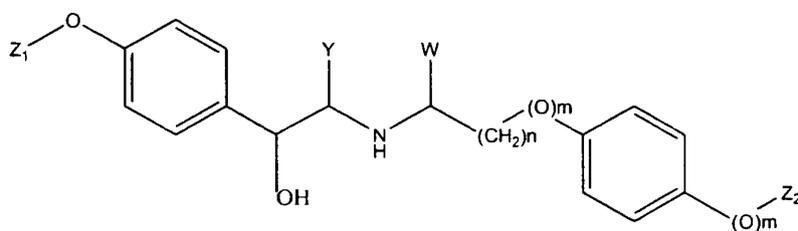
adecuado para el uso en la producción de un anticuerpo capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de una fenetanolamina tal como, pero no limitada a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina, comprendiendo el método la etapa de hacer reaccionar un derivado de fenetanolamina de la fórmula D, en la que Z_1 es un reticulador, con un derivado de fenilalquilcarbonilo de la fórmula E, en la que Z_2 es H; Y es independientemente H o CH_3 ; W es independientemente H o CH_3 ; n es independientemente 1 o 2; y m es independientemente 0 o 1

15



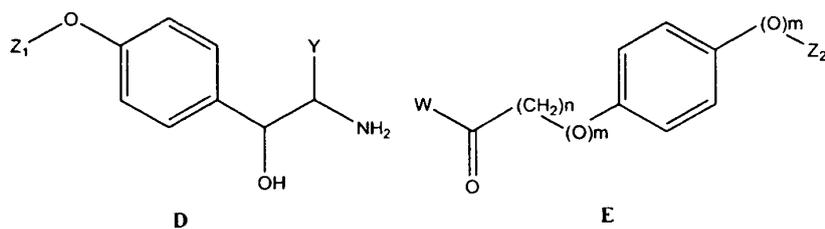
5 Preferiblemente, el derivado de fenetanolamina de la fórmula D se prepara al hacer reaccionar hidrocloreto de octopamina con Z_1X_1 , en el que X_1 es un haluro, preferiblemente un bromuro. Más preferiblemente, el grupo amina del hidrocloreto de octopamina se protege temporalmente con BOC, al hacer reaccionar el hidrocloreto de octopamina con dicarbonato de di-terc-butilo antes de hacer reaccionar el hidrocloreto de octopamina protegido con BOC con el Z_1X_1 , retirándose subsiguientemente el grupo BOC.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para preparar un hapteno de fórmula II



Hapteno II

10 adecuado para el uso en la producción de un anticuerpo capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de una fenetanolamina tal como, pero no limitada a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina, comprendiendo el método la etapa de hacer reaccionar un derivado de fenetanolamina de la fórmula D, en la que Z_1 es H, con un derivado de fenilalcoxicarbonilo de la fórmula E, en la que Z_2 es un reticulador; Y es independientemente H o CH_3 ; W es independientemente H o CH_3 ; n es independientemente 1 o 2; y m es independientemente 0 o 1



15 Preferiblemente, el derivado de fenilalcoxicarbonilo de la fórmula E se prepara al hacer reaccionar 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona con Z_2X_1 , en el que X_1 es un haluro, preferiblemente un bromuro.

20 Preferiblemente, el reticulador es $-R-X_2$. Preferiblemente, R es un enlace bivalente y X_2 es un grupo heterofuncional. Por "heterofuncional" se entiende un grupo funcional que contiene al menos un heteroátomo que es capaz de enlazar el R del reticulador con cualquier material portador que confiera antigenicidad, para formar inmunógenos o, alternativamente, agentes marcadores detectables, para formar conjugados. Más preferiblemente, el grupo heterofuncional X_2 es capaz de reaccionar con cualquier material portador que confiera antigenicidad, para formar inmunógenos o, alternativamente, agentes marcadores detectables, para formar conjugados.

25 Lo más preferiblemente, R se selecciona del grupo que comprende un grupo alquileo saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, y un grupo arileno sustituido o no sustituido tal como un grupo bencileno y X_2 se selecciona del grupo que comprende un ácido carboxílico o un éster del mismo; una amina; una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster del mismo, un aldehído, un grupo ditiopiridilo, un grupo vinilsulfona y

un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo. Más preferiblemente, R es un grupo alquileo saturado de cadena lineal sustituido o no sustituido C₁₋₅, lo más preferiblemente C₁₋₃. Ventajosamente, X₂ se selecciona de un ácido carboxílico o un éster del mismo, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo, un ditiopiridilo, una maleimida, o un grupo aldehído. Lo más ventajosamente, X₂ es un grupo carboxilo (COOH) o un grupo tioacetilo (SCOCH₃).

- 5 Los haptenos resultantes se derivan deliberadamente en un solo grupo hidroxilo fenólico de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina.

Los haptenos resultantes se emplean en la preparación de inmunógenos al acoplarlos a materiales portadores que confieren antigenicidad, modificados o no modificados, para proporcionar inmunógenos para la producción de anticuerpos y conjugados (trazadores) que tienen excelentes sensibilidad y especificidad para la detección o
10 determinación de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para elaborar un inmunógeno que comprende un hapteno preparado 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.

- 15 Los inmunógenos obtenidos se administran a continuación a huéspedes mamíferos para provocar la producción de anticuerpos específicos, preferiblemente anticuerpos policlonales, que se usan a continuación para desarrollar inmunoensayos competitivos para fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina, empleando haptenos conjugados a agentes marcadores como conjugados o reactivos de detección.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación trata de anticuerpos producidos contra los inmunógenos de la presente invención, siendo capaces los anticuerpos de unirse con al menos un epítipo estructural de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina. Preferiblemente, los anticuerpos se fijan sobre un sustrato de apoyo. Más preferiblemente, los anticuerpos muestran una reactividad cruzada, cuando se compara con 100% para ractopamina, isoxsuprina y ritodrina, de menos de 5% para dobutamina. Más preferiblemente, los anticuerpos muestran una reactividad cruzada, cuando se compara con 100%
20 para ractopamina e isoxsuprina, de menos de 2,5%, más preferiblemente menos de 1,5%, para dobutamina. Separadamente o adicionalmente, los anticuerpos producidos para ractopamina muestran una reactividad cruzada, cuando se compara con 100% para ractopamina, de menos de 0,75%, preferiblemente menos de 0,6%, para ritodrina e isoxsuprina. Separadamente o adicionalmente, los anticuerpos producidos para isoxsuprina muestran una reactividad cruzada, cuando se compara con 100% para isoxsuprina, de menos de 0,75%, preferiblemente menos de 0,6%, más preferiblemente menos de 0,25%, para cada una de ritodrina y ractopamina. Separadamente o
30 adicionalmente, los anticuerpos producidos para ritodrina muestran una reactividad cruzada, cuando se compara con 100% para ritodrina, de menos de 0,75%, preferiblemente menos de 0,6%, para ractopamina.

En un aspecto adicional más, la presente invención comprende un método para elaborar un conjugado que comprende un hapteno preparado de acuerdo con el método de la presente invención unido covalentemente a un agente marcador detectable. Preferiblemente, el agente marcador se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radiactiva, o una mezcla de las mismas. Más preferiblemente, el agente marcador es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, lo más preferiblemente peroxidasa de rábano picante (HRP). Alternativamente, o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente.
35

La invención proporciona además un procedimiento para preparar los anticuerpos, comprendiendo el procedimiento las etapas de inmunizar a un animal no humano, preferiblemente un animal no humano vertebrado, lo más preferiblemente un animal no humano mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno preparado de acuerdo con la presente invención, y recoger el suero resultante del animal inmunizado. Preferiblemente, el procedimiento comprende además fijar dichos anticuerpos séricos a un sustrato de apoyo, preferiblemente un soporte sólido, lo más preferiblemente un soporte sólido de poliestireno. Preferiblemente, los anticuerpos son policlonales. Alternativamente, los anticuerpos son monoclonales.
40 45

En un aspecto adicional más, la presente divulgación se refiere a un método para detectar o determinar fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con al menos un conjugado de la presente invención, y con al menos un anticuerpo la presente invención; detectar o determinar el conjugado unido; y deducir de una curva de calibración la presencia de, o la cantidad de, la fenetanolamina en la muestra.
50

En un aspecto adicional, la divulgación incluye un estuche para detectar o determinar fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina, incluyendo el estuche al menos un conjugado preparado de acuerdo con la presente invención; y al menos un anticuerpo preparado de acuerdo con la presente invención. El estuche puede incluir opcionalmente instrucciones para el uso de dichos conjugados y dichos anticuerpos para
55

detectar o determinar fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina en una muestra.

5 Los métodos y estuches que usan anticuerpos y conjugados producidos para ractopamina de la presente invención muestran una IC_{50} de menos de 2,5, preferiblemente menos de 1,5, más preferiblemente menos de 0,75, lo más preferiblemente menos de 0,25, ng/ml para ractopamina. Los métodos y estuches que usan anticuerpos y conjugados producidos para isoxsuprina muestran una IC_{50} de menos de 2,5, preferiblemente menos de 1,5, más preferiblemente menos de 0,75, más preferiblemente menos de 0,25, ng/ml para isoxsuprina. Los métodos y estuches que usan anticuerpos y conjugados producidos para ritodrina muestran una IC_{50} de menos de 250, preferiblemente menos de 150, ng/ml para ritodrina.

10 Preferiblemente, los anticuerpos se proporcionan, se fijan sobre un sustrato de apoyo, siendo preferiblemente el sustrato de apoyo un soporte sólido que es, por ejemplo, un soporte sólido de poliestireno. Este puede tomar la forma de una placa de microvaloración o, alternativamente, un Biochip (Marca Comercial) tal como el que se divulga en US-A-6.498.010. Fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina, si están presentes en el estándar y la muestra, compiten con conjugados que comprenden haptenos unidos covalentemente a un agente marcador detectable tal como, pero no restringido a, peroxidasa de rábano picante, por el número limitado de sitios de anticuerpo sobre el sustrato de apoyo. Después de la incubación a temperatura ambiente para permitir que tenga lugar una reacción de competición, el sustrato de apoyo se lava a continuación para retirar reactivos en exceso. Si el agente marcador es peroxidasa de rábano picante, su sustrato se añade a continuación y sigue un período de incubación para permitir el desarrollo máximo de la señal. En un formato de ELISA, el desarrollo del color se detiene a continuación mediante la adición de ácido y esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La absorbancia se lee a 450 nm. A continuación se construye una curva estándar para determinar la concentración de la fenetanolamina, tal como, pero no limitada a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina en la muestra y el estándar. Alternativamente, en el formato de Biochip, la señal generada típicamente es quimioluminiscente y el nivel de luz generado se cuantifica mediante una cámara de dispositivo acoplado a carga (CCD) para determinar la concentración de las fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina en la muestra o el estándar.

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

30 Las muestras de orina pueden analizarse siguiendo un método de dilución. Sin embargo, si la orina aparece sucia o se requiere un límite de detección inferior, debe usarse un método de extracción apropiado. Una dilución simple implica centrifugar la muestra de orina a, por ejemplo, 13000 rpm durante 10 minutos y a continuación diluir la orina centrifugada diez veces en diluyente diluido/tampón de lavado, después de lo cual la muestra puede aplicarse al sustrato de apoyo.

35 La precisión "intraensayo" del estuche de ELISA se determinó empleando muestras de orina negativas aderezadas con 1 ng/ml y 5 ng/ml. Los resultados eran 5,95 y 6,62% CV, respectivamente. También se determinó la precisión "interensayo" del estuche de ELISA para las mismas muestras de orina aderezadas y los resultados eran 11,83 y 5,90% CV, respectivamente.

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

40 En un aspecto adicional, la presente divulgación implica el uso de los conjugados de la presente invención, o una mezcla de los mismos, con los anticuerpos de la presente invención, o una mezcla de los mismos, para detectar o determinar fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina en muestras tales como tejidos o fluidos biológicos.

Preparación de Haptenos

45 El hapteno éter de [10-O-(carboxipropil)]ractopamina (Hapteno **A** - derivado en la posición 10) se preparó en tres etapas de acuerdo con la Figura 3 de los dibujos adjuntos, a partir de 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona, **2**. La reacción de 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona, **2** con 4-bromobutirato de etilo en dimetilformamida (DMF) en presencia de hidruro sódico (NaH) da 4-[4-(3-oxobutil)fenoxi]butanoato de etilo **3**. El cetoéster, **3**, obtenido se hizo reaccionar con hidrocloreuro de octopamina, **4**, en metanol en presencia de trietilamina (TEA) y cianoborohidruro sódico ($NaBH_3CN$) para dar éter de 10-O-[3-(etoxicarbonil)propil]ractopamina **5** con rendimientos moderados. El hapteno **A** se obtuvo después de la saponificación del éster, **5**, con hidróxido sódico (NaOH) (2 N) en metanol.

El hapteno éter de 10-O-(4-carboxibencil)ractopamina (hapteno **B** - derivado en la posición 10) se preparó mediante el mismo método que el hapteno **A** en tres etapas de acuerdo con la Figura 4 de los dibujos adjuntos, a partir de 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona, **2**. La reacción de **2** con 4-(bromometil)benzoato de metilo, **6**, en DMF en presencia de

NaH, da 4-[4-(3-oxobutil)fenoximetil]benzoato de metilo, **7**. La condensación del cetoéster **7** con hidrocloreuro de octopamina **4** en metanol en presencia de trietilamina (TEA) y cianoborohidruro sódico da el éster **8**. El hapteno **B** se obtuvo después de la saponificación del éster **8** con hidróxido sódico (2 N) en metanol.

5 El hapteno éter de 10'-O-(3-carboxipropil)ractopamina (Hapteno **C** - derivado en la posición 10') se preparó en seis etapas, de acuerdo con la Figura **5** de los dibujos adjuntos, a partir de hidrocloreuro de octopamina **4**. La octopamina protegida con BOC en N, **9**, se obtuvo mediante la reacción de **4** con dicarbonato de di-terc-butilo (BOC₂O) en metanol en presencia de TEA. La reacción de N-BOC-octopamina **9** con 4-bromobutirato de etilo en acetonitrilo en presencia de carbonato potásico (K₂CO₃) da el éster **10** con buen rendimiento. El tratamiento de **10** con ácido trifluoroacético en diclorometano da 4-[4-(2-amino-1-hidroxi)etil]fenoxi]butanoato de etilo, **11**. La condensación del derivado de octopamina **11** con 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona **2** en metanol en presencia de TEA y cianoborohidruro sódico (NaBH₃CN) da éter de 10'-O-[3-(etoxicarbonil)propil]ractopamina **12**. El hapteno éter de 10'-O-(3-carboxipropil)ractopamina, Hapteno **C**, se obtuvo después de la saponificación del éster **12** al usar hidróxido sódico (2 N) en metanol.

15 El hapteno p-(carboximetil)isoxsuprina (Hapteno **D**) se preparó en cuatro etapas de acuerdo con la Figura **6** de los dibujos adjuntos, a partir de hidrocloreuro de alcohol α-(1-aminoetil)-4-hidroxibencílico **13**. La isoxsuprina **15** se obtuvo mediante la reacción de **13** con fenoxi-1-propanona **14** en metanol en presencia de cianoborohidruro sódico y trietilamina. El éster **16** se obtuvo mediante alquilación selectiva de isoxsuprina **15** con bromoacetato de t-butilo en acetonitrilo en presencia de carbonato potásico. El tratamiento del éster **16** con ácido trifluoroacético en diclorometano daba la p-(carboximetil)isoxsuprina, Hapteno **D**.

20 El hapteno p-(carboximetil)ritodrina (Hapteno **E**) se preparó en cuatro etapas de acuerdo con la Figura **7** de los dibujos adjuntos, a partir de 2-(4-hidroxifenil)etanol **17**. La reacción de **17** con bromoacetato de t-butilo en acetonitrilo en presencia de carbonato potásico a 60°C da 2-[4-(t-butoxicarbonilmetoxi)fenil]etanol **18**. La oxidación del alcohol **18** con clorocromato de piridinio (pcc) en diclorometano da el 2-[4-(t-butoxicarbonilmetoxi)fenil]etanal **19**. El éster **20** se obtiene mediante la condensación del aldehído **19** con hidrocloreuro de alcohol α-(1-aminoetil)-4-hidroxibencílico **13** en metanol en presencia de cianoborohidruro sódico y trietilamina. La desprotección del grupo protector t-butilo del éster **20** con HCl 4 M en dioxano a temperatura ambiente da el Hapteno **E** con un rendimiento moderado.

Preparación de Inmunógenos y Conjugados

Aunque los haptenos de la presente invención proporcionan epítomos estructurales definidos, no son inmunogénicos en sí mismos y por lo tanto necesitan conjugarse a materiales portadores, que provocarán una respuesta inmunogénica cuando se administren a un animal huésped. Materiales portadores apropiados contienen comúnmente segmentos de poli(aminoácido) e incluyen polipéptidos, proteínas y glicoproteínas. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, globulina que se une a tiroxina, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), etc. Alternativamente, pueden emplearse poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, como también otros materiales poliméricos sintéticos o naturales que tienen grupos funcionales reactivos. En particular, carbohidratos, levaduras o polisacáridos pueden conjugarse al hapteno para producir un inmunógeno.

Cada hapteno preparado de acuerdo con la presente invención también puede acoplarse a un agente marcador detectable tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), una sustancia que tiene propiedades luminiscentes, quimioluminiscentes o fluorescentes o un marcador radiactivo para la preparación de conjugados (o reactivos de detección) para el uso en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado de la misma.

A fin de confirmar que se ha alcanzado una conjugación adecuada del hapteno al material portador, antes de la inmunización, cada inmunógeno se evalúa usando espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS). Cada uno de los inmunógenos de la presente invención es adecuado para la inmunización, a fin de producir anticuerpos para la detección de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina.

Procedimiento General para el Análisis de Inmunógenos por MALDI-TOF.

50 Se realizó espectrometría de masas MALDI-TOF usando un espectrómetro de masas de desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Una parte alícuota de cada muestra que había de analizarse se diluyó en ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1% para crear soluciones de muestra de 1 mg/ml. Las partes alícuotas (1 µl) se analizaron usando una matriz de ácido sinapínico y se usó albúmina de suero bovino (Fluka) como un calibrador externo.

Preparación de Antisueros

- 5 A fin de generar antisueros policlonales, cada inmunógeno de la presente invención se mezcla con adyuvante de Freund y la mezcla se inyecta en un animal huésped, tal como un conejo, una oveja, un ratón, un cobaya o un caballo. Se realizan inyecciones adicionales (dosis de recuerdo) y el suero se muestrea para la evaluación de la concentración de anticuerpo. Cuando se ha alcanzado la concentración óptima, el animal huésped se sangra para dar un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de anticuerpo requerido depende de la aplicación pretendida. Para muchos propósitos, no se requiere purificación, sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo ha de ser inmovilizado sobre un soporte sólido, pueden adoptarse etapas de purificación para retirar material no deseado y eliminar la unión no específica.
- 10 Los anticuerpos específicos preparados en esta invención son útiles como reactivos en inmunoensayos para la detección o la determinación de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina en fluidos biológicos.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Preparación de 4-[4-(3-Oxobutil)fenoxi]butanoato de etilo 3**

- 15 A una suspensión de hidruro sódico (dispersión al 60% en aceite mineral) (7,3 g, 0,183 moles) en DMF anhidro (100 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se añadió gota a gota 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona **2** (20,0 g, 0,122 moles) en DMF anhidro (100 ml) y la mezcla se agitó a continuación a temperatura ambiente durante una hora. A esta mezcla se añadió gota a gota 4-bromobutirato de etilo (28,5 g, 0,146 moles) en DMF anhidro (50 ml), y la mezcla se agitó a continuación a 60°C durante la noche. La DMF se retiró bajo presión reducida y a continuación se añadió agua (200 ml) al residuo y se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1 x 200 ml), se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 20% en hexano como eluyente para dar **3** como un aceite incoloro (16,95 g, 50%).

IR (Película): 1732; 1720; 1612,5; 1512,9; 1245,1 y 1178.

- 25 **Ejemplo 2: Preparación de Éter de 10-O-[3-(etoxicarbonil)propil]ractopamina 5**

- 30 A una solución de **3** (16,95 g, 0,061 moles) y HCl de octopamina (11,57 g, 0,061 moles) en metanol (300 ml) se añadieron TEA (12,35 g, 0,122 moles) y cianoborohidruro sódico (3,83 g, 0,061 moles). La mezcla se agitó a 50°C durante la noche. Los disolventes se retiraron a vacío. Se añadió al residuo HCl (1 N) (150 ml) y agua (150 ml) y se lavó con éter (1 x 300 ml). La fase acuosa se ajustó hasta pH 12-13 usando hidróxido sódico (6 N) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando metanol al 5-10% en cloroformo para dar el compuesto del epígrafe **5** (7 g, 28%) como un sólido blanco. IR (KBr): 3506; 3301,2; 1735,8; 1613,2; 1512,6; 1374,03; 1244,1; 1176,9 y 1046,5.

Ejemplo 3: Preparación de Éter de 10-O-(3-carboxipropil)ractopamina (Hapteno A).

- 35 A la solución del éster **5** (7 g, 0,169 moles) en metanol (90 ml) se añadió hidróxido sódico (2 N) (30 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los disolventes se retiraron a vacío y se añadió agua (50 ml). El pH de la solución se ajustó hasta 3-4 mediante la adición de HCl (1 N) y el precipitado obtenido resultante se recogió mediante filtración y se secó en un desecador sobre P₂O₅. El hapteno **A** se obtuvo como un sólido blanco (5,64 g, 86%).

- 40 **Ejemplo 4: Preparación de 4-[4-(3-Oxobutil)fenoximetil]benzoato de metilo 7.**

El éster **7** se obtuvo al usar el mismo método que se describe en el Ejemplo 1 usando 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona **2** (20 g, 0,122 moles), hidruro sódico (7,3 g, 0,183 moles) y 4-(bromometil)benzoato de metilo (**3**) (33,44 g, 0,146 moles). El compuesto del epígrafe **7** se obtuvo como un aceite transparente (23,2 g, 61%).

Ejemplo 5: Preparación de Éter de 10-O-[4-(metoxicarbonil)encil]ractopamina 8.

- 45 El éster **8** se obtuvo al usar el mismo método que se describe en el Ejemplo 2 para la preparación de **5**, usando el éster **7** (10,3 g, 0,33 moles), hidrocloreuro de octopamina **4** (6,26 g, 0,33 moles), trietilamina (6,68 g, 0,066 moles) y cianoborohidruro sódico (2,07 g, 0,33 moles). El éster **8** se obtuvo con rendimiento moderado (7 g, 50%). IR (KBr): 3171,4; 3025,6; 2942,3; 2850,69; 1717,08; 1612,84; 1595,68; 1511,9; 1281,1; 1250,1 y 1107.

Ejemplo 6: Preparación de Éter de 10-O-(4-carboxibencil)ractopamina (hapteno B).

El hapteno B se obtuvo con 77% de rendimiento como un sólido blanco usando el mismo método que se describe para la preparación del hapteno A (cfr. el Ejemplo 3). IR (KBr): 3118,8; 3034,2; 1700,7; 1613,6; 1515,56;

5 NMR ¹³C (CD30D): 169,6; 158,6; 158,5; 144,2; 134,2; 132,9; 131,3 (2C); 130,9 (2C); 130,5; 128,4 (2C); 128,1 (2C); 116,4 (2C); 116,1 (2C); 70,3; 70,1; 52,3; 52,25; 35,4; 31,8 y 16,5.

Ejemplo 7: Preparación de N-[2-Hidroxi-2-(4-hidroxifenil)etil]-t-butilcarboxamida 9.

10 A una solución de hidrocloreto de octopamina 4 (18,96 g, 0,1 moles) en metanol (200 ml) se añadieron TEA (20,24 g, 0,2 moles) y dicarbonato de di-terc-butilo (26,19 g, 0,12 moles). La mezcla se agitó a continuación a temperatura ambiente durante la noche. Los disolventes se retiraron a vacío y el residuo en bruto obtenido se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando acetato de etilo como eluyente para dar N-BOC-octopamina 9 (23,2 g, 80%) como un sólido blanco.

Ejemplo 8: Preparación de 4-{4-[2-(t-Butilcarboxamido)-1-hidroxietil]fenoxi}butanoato de etilo 10.

15 A una solución de N-BOC-octopamina 9 (23,2 g, 0,08 moles) en acetonitrilo (400 ml) se añadieron carbonato potásico (44,29 g, 0,32 moles) y bromobutirato de etilo (23,41 g, 0,12 moles). La mezcla se agitó y se calentó a reflujo durante la noche. La solución se dejó enfriar a continuación hasta temperatura ambiente, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 50% en hexano como eluyente para dar el compuesto del epígrafe 10 (24,53 g, 78%) como un aceite transparente. IR (Película): 3434,2; 2979,7; 2934,5; 1731,3 (ancho); 1611,9; 1512,5; 1367,5; 1247,2 y 1172,8.

Ejemplo 9: Preparación de Sal de ácido trifluoroacético de 4-[4-(2-amino-1-hidroxietil)fenoxi]butanoato de etilo 11.

20 A una solución de etil-4-(carboxipropil)-N-BOC-octopamina 10 (14,26 g, 0,0363 moles) en diclorometano (80 ml) se añadió ácido trifluoroacético (40 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los disolventes se retiraron a vacío y el producto en bruto obtenido se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando (metanol al 10% en cloroformo) para dar el compuesto del epígrafe 11 (12,2 g, 83%) como un aceite viscoso.

Ejemplo 10: Preparación de Éter de 10'-O-[3-(etoxicarbonil)propil]ractopamina 12.

30 El éster 12 se preparó mediante la condensación del compuesto 11 (21,89 g, 0,0574 moles) con 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona 2 (9,43 g, 0,0574 moles) usando el mismo método que se describe para la preparación de 5 y 8. El compuesto del epígrafe 12 (10 g, 42%) se obtuvo como un aceite amarillo.

IR (Película): 3297,7 (ancho); 2936,7; 1732,1; 1612,07; 1514,5; 1446,4; 1375,5; 1174,3 y 1029,7

Ejemplo 11: Preparación de Éter de 10'-O-(3-carboxipropil)ractopamina, hapteno C.

El hapteno C se obtuvo después de la saponificación del éster 12, usando el mismo método que se describe para la preparación de los haptenos A y B, como un sólido blanco (6,2 g, 66%).

35 NMR ¹³C (CD30D): 177,17; 160,46; 156,9; 134,3; 132,4; 130,4 (2C); 128,4 (2C); 116,4 (2C), 115,7 (2C); 70,0; 68,1, 55,4; 52,2; 35,6; 31,7; 31,5; 25,8 y 16,5

Ejemplo 12: Preparación de Isoxsuprina 15.

40 A una solución de alcohol α-(1-aminoetil)-4-hidroxibencílico 13 (10,0 g, 0,049 moles) y fenoxi-2-propanona 14 (7,4 g, 0,049 moles) en metanol (200 ml) se añadió TEA (10,5 g, 0,102 moles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los disolventes se retiraron a vacío. Se añadieron al residuo HCl (1N) (100 ml) y agua (100 ml) y esto se extrajo con acetato de etilo (1 x 200 ml). La fase acuosa se basificó (pH 12-13) usando hidróxido sódico (6 N) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera (1 x 200 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando metanol al 10% en cloroformo para dar isoxsuprina 15 (8 g, 54%) como un sólido blanco, p. f. 102-104°C.

45

Ejemplo 13: Preparación de Éter de 10'-O-(4-terc-butoxicarbonilmetil)isoxsuprina 16.

La isoxsuprina **15** (3,1 g, 10,3 milimoles) se disolvió en acetonitrilo (100 ml). Se añadieron a esta solución carbonato potásico (4,48 g, 32,4 milimoles) y bromoacetato de terc-butilo (3,16 g, 16,2 milimoles) y la mezcla se calentó a reflujo durante la noche. La mezcla se dejó enfriar, se filtró y el filtrado se concentró a vacío. El producto en bruto así
 5 obtenido se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando metanol al 5% en cloroformo para dar **16** (2,27 g, 52%) como un aceite incoloro. NMR ¹³C (CDCl₃): 168,1, 158,7, 157,0, 134,5, 128,5, 127,3, 120,9, 114,5, 83,3, 73,7, 71,9, 65,9, 56,0, 49,6, 28,0, 18,3 y 15,2.

Ejemplo 14: Preparación de Éter de 10'-O-(4-carboximetil)isoxsuprina, Hapteno D

A una solución de éter de 10'-O-(4-terc-butoxicarbonilmetil)isoxsuprina **16** (2,08 g, 4,8 milimoles) en diclorometano
 10 (25 ml) se añadió ácido trifluoroacético (10 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente se retiró a vacío y el producto en bruto obtenido se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando metanol al 10% en cloroformo para dar el Hapteno **D** como una sal de TFA (1,5 g, 66%).

Ejemplo 15: Preparación de 4-[2-Hidroxietil]fenoxiacetato de terc-butilo 18.

A una solución de 2-(4-hidroxifenil)etanol **17** (27,6 g, 0,2 moles) en acetonitrilo (300 ml) se añadió carbonato
 15 potásico (110,5 g, 0,8 moles) y bromoacetato de terc-butilo (46,8 g, 0,24 moles) y la mezcla se agitó y se calentó a reflujo durante dos horas. La mezcla se dejó enfriar, se filtró y el filtrado se concentró a vacío. El producto en bruto obtenido se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice al usar acetato de etilo al 30% en hexano para dar 4-[2-hidroxietil]fenoxiacetato de terc-butilo **18** (39,8 g, 83%) como un aceite transparente.

Ejemplo 16: Preparación de 4-[Formilmetil]fenoxiacetato de terc-butilo 19.

A una solución de **18** (20,0 g, 0,083 moles) en diclorometano anhidro (200 ml) se añadió clorocromato de piridinio
 20 (PCC) (44,7 g, 0,207 moles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, se añadió éter (500 ml) para extinguir la reacción y la mezcla se filtró a continuación a vacío a través de Celite (Marca Comercial). La evaporación de los disolventes a vacío proporcionaba el producto en bruto que se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 20% en hexano para dar **19** (16,6 g, 80%) como un aceite amarillo.

Ejemplo 17: Preparación de 4-[-2-(beta-Hidroxi-alfa-metil-4-hidroxifenetilamino)etil]fenoxiacetato de terc-butilo, 20.

El éster **20** se preparó mediante condensación de 4-[formilmetil]fenoxiacetato de terc-butilo (10,0 g, 0,04 moles) con
 30 alcohol α-(1-aminoetil)-4-hidroxibencílico **13** (8,2 g, 0,04 moles) usando el mismo método que se describe para la preparación de **5**, **8** y **16**. El éster **20** (8,18 g, 51%) se obtuvo como un aceite amarillo.

Ejemplo 18: Preparación de Ácido 4-[-2-(beta-hidroxi-alfa-metil-4-hidroxifenetilamino)etil]fenoxietanoico, Hapteno E

A una solución del éster terc-butílico **20** (3,7 g, 0,92 milimoles) en 25 ml de dioxano anhidro se añadió solución de
 35 ácido clorhídrico (4 M) en dioxano (25 ml) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La evaporación de los disolventes a vacío proporcionaba el producto en bruto que se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre gel de sílice usando metanol al 10% en cloroformo para dar la sal de HCl del hapteno **E** (1,2 g, 34,2%) como un sólido espumoso.

NMR ¹³C (CD₃OD): 171,4, 159,6, 158,6, 132,6 (2), 131,6 (2), 130,8 (2), 128,3 (2), 116,6, 116,1, 84,8, 66,8, 59,8, 52,7, 32,6 y 19,4.

Ejemplo 19: Conjugación de los Haptenos A, B, C, D y E a BSA (Preparación de los Inmunógenos A, B, C, D y E).

A una solución del hapteno **A**, **B**, **C**, **D** o **E** (58 mg, 0,15 mmoles) en DMF (1 ml) se añadieron N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (34 mg, 0,165 mmoles) y N-hidroxisuccinimida (19 mg, 0,165 mmoles) y la mezcla se
 45 agitó a temperatura ambiente durante la noche. La diciclohexilurea formada se retiró mediante filtración y el filtrado se añadió gota a gota a una solución de BSA (200 mg) en hidrogenocarbonato sódico 0,1 M, pH 8,5 (12 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se dializó contra tampón de fosfato 50 mM, pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4°C y a continuación se liofilizó.

Los resultados de MALDI mostraban que 17 moléculas de hapteno **A**, 5,8 moléculas de hapteno **B**, 10,7 moléculas

de hapteno **C**, 12,4 moléculas de Hapteno **D** y 6,2 moléculas para el hapteno **E** se han conjugado a 1 molécula de BSA.

Ejemplo 20: Método general para la conjugación de los Haptenos A, B, C, D y E a HRP (Peroxidasa de rábano picante).

5 EDC.HCl (10 mg) se disolvió en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una solución de Hapteno (**A** o **B** o **C** o **D** o **E**) (2 mg) en DMF (0,2 ml). Después de mezclar, esta solución se añadió gota a gota a una solución de HRP (20 mg) en agua (1 ml). Se añadió sulfo-NHS (5 mg) y la mezcla de reacción se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. El hapteno en exceso se retiró al desalar con columnas PD-10 (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS (solución salina tamponada con fosfato) a pH 7,2. El conjugado hapteno-HRP se dializó a continuación durante la noche contra 10 l de PBS, pH 7,2, a 4°C.

Ejemplo 21: Preparación de anticuerpos para los Inmunógenos A y C, preparados en el Ejemplo 19.

Una solución acuosa de cada inmunógeno se formuló con adyuvante completo de Freund (FCA) para formar una emulsión que consistía en 2 mg/ml de inmunógeno en FCA al 50% (v/v). Tres ovejas fueron inmunizadas con esta emulsión (1ª inmunización), inyectándose subcutáneamente 0,25 ml en cada una de cuatro zonas del costado de cada animal. Las inmunizaciones subsiguientes (dosis de recuerdo) contenían 1 mg/ml de inmunógeno. Todas las dosis de recuerdo se emulsionaron en adyuvante incompleto de Freund (FIA) al 50% (v/v) y se administraron del mismo modo que la 1ª inmunización, a intervalos mensuales durante 1 año. El muestreo de sangre tuvo lugar de 7 a 14 días después de cada dosis de recuerdo. Cada muestra se procesó para producir antisuero, que se purificó adicionalmente mediante precipitación con ácido caprílico y sulfato amónico para dar una fracción de inmunoglobulina G (IgG). La fracción de IgG se evaluó mediante un ensayo en placa de microvaloración tipo ELISA competitivo, según se describe en el Ejemplo 22 posteriormente.

Ejemplo 22: Desarrollo de ELISA competitivos para ractopamina.

a) Los pocillos de una placa de microvaloración de poliestireno de 96 pocillos con unión mejorada se revistieron con la fracción de IgG del antisuero producido para el inmunógeno **A** (hapteno **A**-BSA) (Ejemplo 19), diluida en Tris 10 mM, pH 8,5 (125 µl/pocillo). La dilución apropiada del revestimiento de anticuerpo se determinó usando técnicas de tablero de ajedrez de ELISA estándar. La placa se incubó durante 2 horas a 37°C, se lavó 4 veces con solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 (TBST) y se secó. Se prepararon soluciones estándar de ractopamina en TBST a 0, 0,05, 0,1, 0,5, 1 y 5 ng/ml, y µl de cada una se añadieron a los pocillos apropiados. 75 µl de conjugado **A** (hapteno **A**-HRP) (Ejemplo 20), diluidos en tampón de Tris (pH 7,2) que contenía EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA, se añadieron a cada uno de los pocillos. La dilución apropiada de conjugado también se determinó usando técnicas de tablero de ajedrez de ELISA estándar. La placa se incubó a 37°C durante 2 horas. El conjugado no unido en exceso se retiró al lavar 6 veces durante un período de 10 minutos con TBST. 125 µl de solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) se añadieron a cada pocillo de la placa que se incubó a continuación durante de 15 a 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se terminó mediante la adición de 125 µl de H₂SO₄ 0,2 M a cada pocillo. La absorbancia se midió a continuación a 450 nm usando un lector de placas de microvaloración. Los datos generados en el ensayo se presentan en la Tabla 1.

b) De un modo similar al descrito en el Ejemplo 15(a), los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos se revistieron con la fracción de IgG del antisuero producido para el inmunógeno **C** (hapteno **C**-BSA) (Ejemplo 19), los estándares se aplicaron a 0, 0,025, 0,1, 0,25, 0,5 y 1 ng/ml y el conjugado **C** (hapteno **C**-HRP) (Ejemplo 20) se empleó como reactivo de detección. Los datos generados se presentan en la Tabla 1. Las mismas definiciones se aplican para A₄₅₀, B, B₀ e IC₅₀.

Tabla 1: Datos generados a partir de ensayos en placa de microvaloración competitivos para ractopamina, empleando antisueros generados para el inmunógeno A (hapteno A-BSA) (Ejemplo 19) y el inmunógeno C (hapteno C-BSA) (Ejemplo 19).

Ejemplo 22 a)			Ejemplo 22b)		
Concentración de Ractopamina ng/ml	A ₄₅₀ ng/ml	%B/B ₀	Concentración de Ractopamina ng/ml	A ₄₅₀	%B/B ₀
0	2,385	100	0	1,994	100
0,05	1,276	53,5	0,025	1,683	84

(continuación)

Ejemplo 22 a)			Ejemplo 22b)		
Concentración de Ractopamina ng/ml	A ₄₅₀ ng/ml	%B/B ₀	Concentración de Ractopamina ng/ml	A ₄₅₀	%B/B ₀
0,1	1,181	49,5	0,1	1,302	65
0,5	0,566	23,7	0,25	0,918	46
1	0,404	16,9	0,5	0,68	34
5	0,151	6,33	1	0,469	24
IC ₅₀ (ng/ml)	0,082	IC ₅₀ (ng/ml)	0,202		
A ₄₅₀ = absorbancia a 450 nm B = absorbancia a 450 nm a una concentración de estándar de x ng/ml B ₀ = absorbancia a 450 nm a una concentración de estándar de 0 ng/ml IC ₅₀ = concentración de estándar que produce 50% de B/B ₀ %CR = porcentaje de reactividad cruzada basado en la especificidad para ractopamina - esto es lo que se entiende por el término "reactividad cruzada" en la presente memoria descriptiva.					

Ejemplo 23: Reactividad Cruzada de ELISA Competitivos para Ractopamina

- 5 A fin de determinar la especificidad de los ELISA competitivos para ractopamina, soluciones estándar de una gama de β-agonistas estructuralmente similares se prepararon en TBST. Empleando cada serie de estándares en los ELISA competitivos para ractopamina, se generaron curvas de calibración y estas se usaron para determinar la reactividad cruzada de cada inmunoensayo con estas sustancias. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 2, calculándose la reactividad cruzada de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

10

en la que %CR es el porcentaje de reactividad cruzada, IC_{50, ractopamina} es la concentración de ractopamina que provoca 50% de desplazamiento de la señal y IC_{50, CR} es la concentración de reaccionante cruzado potencial que provoca 50% de desplazamiento de la señal.

Tabla 2: Reactividad cruzada de los ELISA competitivos para ractopamina

Compuesto	Ejemplo 23 a)		Ejemplo 23 b)		pAb de Shelver		mAb de Shelver	
	IC _{50 CR} ng/ml	%CR	IC _{50 CR} ng/ml	%CR	IC _{50 CR} ng/ml	%CR	IC _{50 CR} ng/ml	%CR
Ractopamina	0,082	100	0,202	100	4,2	100	2,69	100
Dobutamina	44,2	0,186	>50	<0,8	12,7	33	50,3	5,3
Isoxsuprina	>50	<0,16	>50	<0,6	6.200	0,1	1,391	0,2
DL-Isoproterenol	>50	<0,16	>50	<0,5	>100.000	<0,01	NA	NA

(continuación)

Compuesto	Ejemplo 23 a)		Ejemplo 23 b)		pAb de Shelver		mAb de Shelver	
	IC ₅₀ CR ng/ml	%CR	IC ₅₀ CR ng/ml	%CR	IC ₅₀ CR ng/ml	%CR	IC ₅₀ CR ng/ml	%CR
Ritodrina	>50	<0,16	>50	<0,5	577	0,8	73,8	3,6
Xinafoato de Salmeterol	>50	<0,16	>50	<0,5	1,800	0,2	1519	0,2
Metil-Clembuterol	>50	<0,16	>50	<0,05	NA	NA	NA	NA
Fenoterol	>50	<0,16	>50	<0,05	310	1,3	2.682	0,1
Pirbuterol	>50	<0,16	>50	<0,05	NA	NA	NA	NA
Tulobuterol	>50	<0,16	>50	<0,05	NA	NA	NA	NA
Dopamina	>50	<0,16	>50	<0,01	NA	NA	NA	NA
Salbutamol	>50	<0,16	>50	<0,01	79.000	<0,01	NA	<0,1
Clembuterol	>50	<0,16	>50	<0,01	>100.000	<0,01	NA	<0,1
Metaproterenol	>50	<0,16	>50	<0,01	>100.000	<0,01	NA	NA
Terbutalina	>50	<0,16	>50	<0,01	NA	NA	NA	NA
Cimaterol	>50	<0,16	>50	<0,01	NA	NA	NA	NA
Bametano	>50	<0,16	>50	<0,01	2.900	0,1	831	0,3
(-) Isoproterenol	>50	<0,16	>50	<0,01	NA	NA	NA	NA
Mabuterol	>50	<0,16	>50	<0,01	NA	NA	NA	NA

IC_{50,CR} = concentración de reaccionante cruzado potencial de provoca 50% de desplazamiento de la señal
 %CR = porcentaje de reactividad cruzada basado en la especificidad para ractopamina
 pAb de Shelver = antisuero policlonal de Shelver (Shelver y Smith, Journal of Immunoassay (2000), 21(1))
 mAb de Shelver = anticuerpo monoclonal de Shelver (Shelver et ál., J. Agric. Food Chem. 48 (2000))

5 Los datos presentados en la Tabla 2 indican que los inmunoensayos de ractopamina desarrollados empleando anticuerpos generados para el hapteno **A** y el hapteno **B** son altamente sensibles con valores de IC₅₀ de 0,082 y 0,202 ng/ml, respectivamente. Estos inmunoensayos son considerablemente más sensibles que los presentados en la técnica anterior. Por ejemplo, Shelver et ál. (2000) presentaban una IC₅₀ de 4,2 ng/ml para su EIA con ractopamina. Los datos de especificidad presentados en la Tabla 2 indican que los anticuerpos empleados son altamente específicos para ractopamina. Hay una reactividad cruzada insignificante con dobutamina (<0,8%) para ambos anticuerpos en la presente solicitud, en comparación con la publicada en la técnica anterior. Por ejemplo, Shelver et ál. presentaban 33% de reactividad cruzada con dobutamina para su anticuerpo policlonal y 5,3% de reactividad cruzada con dobutamina para su anticuerpo monoclonal.

15 Los anticuerpos derivados de ractopamina de la presente invención darán por lo tanto resultados altamente específicos cuando se rastrean muestras biológicas con respecto a la presencia de ractopamina.

Ejemplo 24: Desarrollo de un ELISA Competitivo para Isoxsuprina

De un modo similar al descrito en el Ejemplo 22(a), los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos se revistieron con la fracción de IgG del antisuero producido para el inmunógeno **D** (hapteno **D**-BSA) (Ejemplo 19), se aplicaron estándares de isoxsuprina a 0, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 y 200 ng/ml y el conjugado **D** (hapteno **D**-HRP) (Ejemplo 20) se empleó como reactivo de detección. Los datos generados se presentan en la Tabla 3.

Ejemplo 25: Desarrollo de un ELISA Competitivo para Ritodrina

De un modo similar al descrito en el Ejemplo 22(a), los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos se revistieron con la fracción de IgG del antisuero producido para el inmunógeno **E** (hapteno **E**-BSA) (Ejemplo 19), se aplicaron estándares de ritodrina a 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 ng/ml y el conjugado **E** (hapteno **E**-HRP) (Ejemplo 20) se empleó como reactivo de detección. Los datos generados también se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Datos generados a partir de ensayos en placa de microvaloración competitivos para isoxsuprina y ritodrina, empleando antisueros generados para el inmunógeno **D** (hapteno **D**-BSA) (Ejemplo 19) y el inmunógeno **E** (hapteno **E**-BSA) (Ejemplo 19).

Ejemplo 24			Ejemplo 25		
Concentración de Isoxsuprina ng/ml	A ₄₅₀	%B/B ₀	Concentración de Ritodrina ng/ml	A ₄₅₀	%B/B ₀
0	2,345	100	0	1,946	100
0,5	0,743	31,6	1	1,791	92,0
1	0,399	17,0	5	1,602	82,3
5	0,158	6,7	10	1,562	80,2
10	0,115	4,9	50	1,260	64,7
50	0,036	1,5	100	1,088	55,9
100	0,032	1,3	500	0,584	30,0
200	0,022	0,9	1000	0,440	22,6
IC₅₀ (ng/ml)	0,230		IC₅₀ (ng/ml)	115,230	
A ₄₅₀ = absorbancia a 450 nm B = absorbancia a 450 nm a una concentración de estándar de x ng/ml B ₀ = absorbancia a 450 nm a una concentración de estándar de 0 ng/ml IC ₅₀ = concentración estándar que produce 50% de B/B ₀					

15 Ejemplo 26: Reactividad cruzada de ELISA Competitivos para Isoxsuprina y Ritodrina

De un modo similar al descrito en el Ejemplo 23, se determinó la reactividad cruzada de cada inmunoensayo con isoxsuprina, ritodrina, dobutamina y ractopamina. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 4.

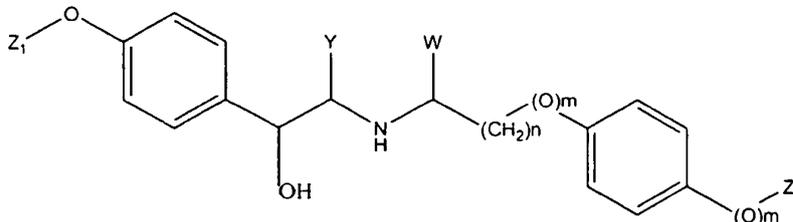
Tabla 4: Reactividad cruzada de los ELISA competitivos para isoxsuprina (Ejemplo 24) y ritodrina (Ejemplo 25)

Compuesto	Ejemplo 24		Ejemplo 25	
	IC _{50 CR} ng/ml	%CR	IC _{50 CR} ng/ml	%CR
Isoxsuprina	0,230	100	569,7	20,2
Ritodrina	>200	<0,1	115,2	100
Dobutamina	>200	<0,1	>1000	<5,0
Ractopamina	>200	<0,1	>1000	<0,5
IC _{50 CR} = Concentración de reaccionante cruzado potencial que provoca 50% de desplazamiento de señal %CR = Porcentaje de reactividad cruzada basado en la especificidad para isoxsuprina (Ejemplo 24) o ritodrina (Ejemplo 25)				

5 Este alto grado de especificidad mostrado en los Ejemplos 23 y 26 se ha alcanzado mediante una derivación dirigida en uno solo grupo hidroxifenólico de fenetanolaminas tales como, pero no limitadas a, ractopamina, isoxsuprina y ritodrina y asegura que los resultados positivos falsos se mantienen en un mínimo.

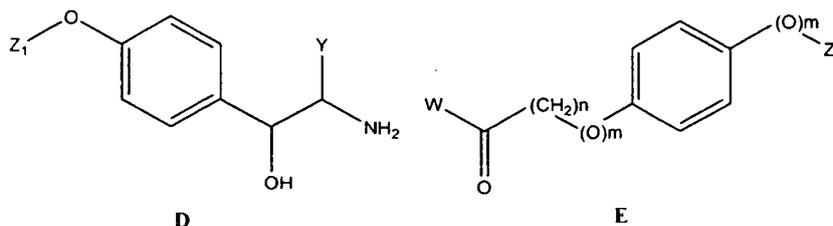
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un hapteno de fórmula I



Hapteno I

5 adecuado para el uso en la producción de un anticuerpo capaz de unirse a al menos un epítipo estructural de una fenetanolamina tal como, pero no limitada a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina, comprendiendo el método la etapa de hacer reaccionar un derivado de fenetanolamina de la fórmula D, en la que Z₁ es un reticulador, con un derivado de fenilalquilcarbonilo de la fórmula E, en la que Z₂ es H; Y es independientemente H o CH₃; W es independientemente H o CH₃; n es independientemente 1 o 2; y m es independientemente 0 o 1



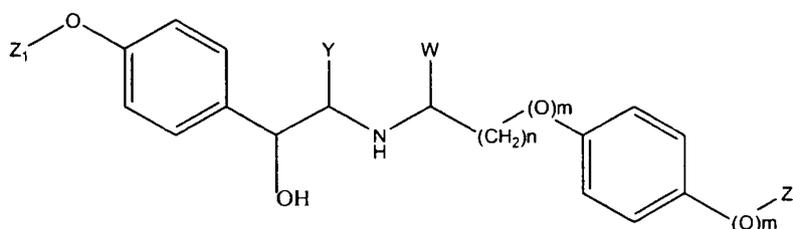
10

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el derivado de fenetanolamina de la fórmula D se prepara al hacer reaccionar hidrocloreto de octopamina con Z₁X₁, en el que X₁ es un haluro, preferiblemente un bromuro.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el grupo amina del hidrocloreto de octopamina se protege temporalmente con BOC, al hacer reaccionar el hidrocloreto de octopamina con dicarbonato de di-terc-butilo antes de hacer reaccionar el hidrocloreto de octopamina protegido con BOC con el Z₁X₁, retirándose subsiguientemente el grupo BOC.

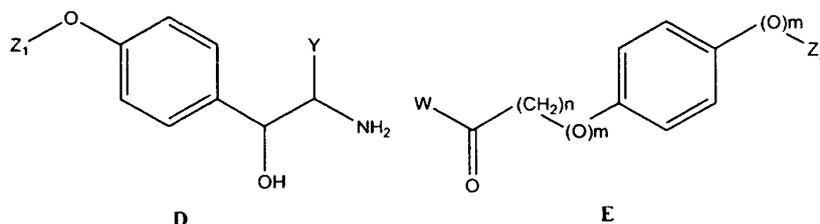
15

4. Un método para preparar un hapteno de fórmula II



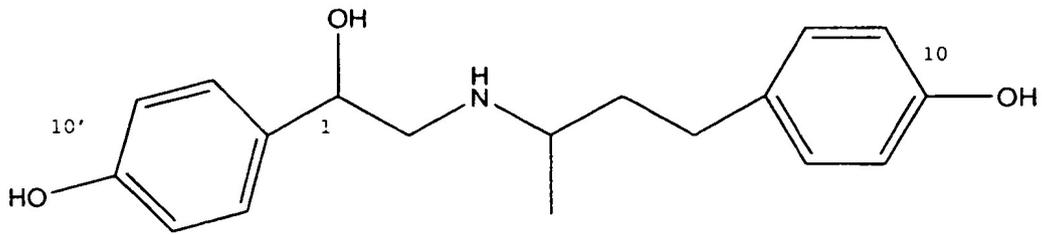
Hapteno II

20 adecuado para el uso en la producción de un anticuerpo capaz de unirse a al menos un epítipo estructural de una fenetanolamina tal como, pero no limitada a, ractopamina, isoxsuprina o ritodrina, comprendiendo el método la etapa de hacer reaccionar un derivado de fenetanolamina de la fórmula D, en la que Z₁ es H, con un derivado de fenilalcoxycarbonilo de la fórmula E, en la que Z₂ es un reticulador; Y es independientemente H o CH₃; W es independientemente H o CH₃; n es independientemente 1 o 2; y m es independientemente 0 o 1

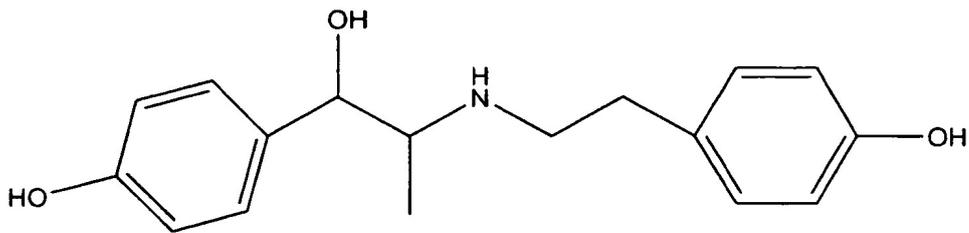


5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el derivado de fenilalquilcarbonilo de la fórmula E se prepara al hacer reaccionar 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona con Z_2X_1 , en el que X_1 es un haluro, preferiblemente un bromuro.
- 5 6. Un método para elaborar un inmunógeno, comprendiendo el método preparar un hapteno de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y acoplar el hapteno a un material portador que confiere antigenicidad, seleccionándose preferiblemente el material portador del grupo que comprende una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético y un polipéptido semisintético.
- 10 7. Un método para elaborar un inmunógeno, comprendiendo el método preparar un hapteno de acuerdo con el método de la reivindicación 4 o 5; y acoplar el hapteno a un material portador que confiere antigenicidad, seleccionándose preferiblemente el material portador del grupo que comprende una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético y un polipéptido semisintético.
- 15 8. Un método para elaborar un anticuerpo, comprendiendo el método preparar un inmunógeno de acuerdo con el método de la reivindicación 6 e inmunizar un animal no humano con el inmunógeno, siendo capaz el anticuerpo de unirse a al menos un epítipo estructural de una fenetanolamina tal como ractopamina, isoxsuprina o ritodrina.
9. Un método para elaborar un anticuerpo, comprendiendo el método preparar un inmunógeno de acuerdo con el método de la reivindicación 7 e inmunizar un animal no humano con el inmunógeno, siendo capaz el anticuerpo de unirse a al menos un epítipo estructural de una fenetanolamina tal como ractopamina, isoxsuprina o ritodrina.
- 20 10. Un método para elaborar un conjugado, comprendiendo el método preparar un hapteno de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y unir covalentemente el hapteno a un agente marcador detectable, seleccionándose preferiblemente el agente marcador del grupo que comprende una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia quimioluminiscente y una sustancia radiactiva.
- 25 11. Un método para elaborar un conjugado, comprendiendo el método preparar un hapteno de acuerdo con el método de la reivindicación 4 o 5; y unir covalentemente el hapteno a un agente marcador detectable, seleccionándose preferiblemente el agente marcador del grupo que comprende una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia quimioluminiscente y una sustancia radiactiva.

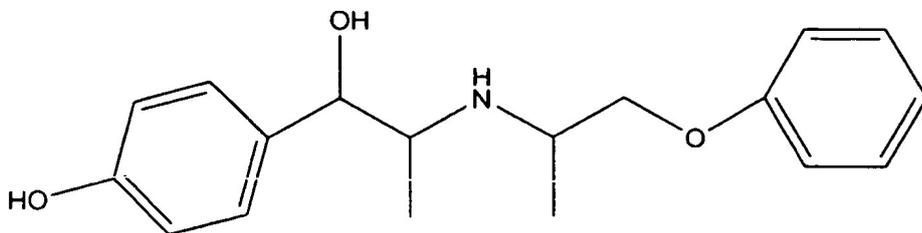
Estructuras químicas de Ractopamina, Ritodrina e Isoxsuprina



Ractopamina



Ritodrina



Isoxsuprina

Figura - 1

Estructura Química de los Haptenos A, B, C, D y E

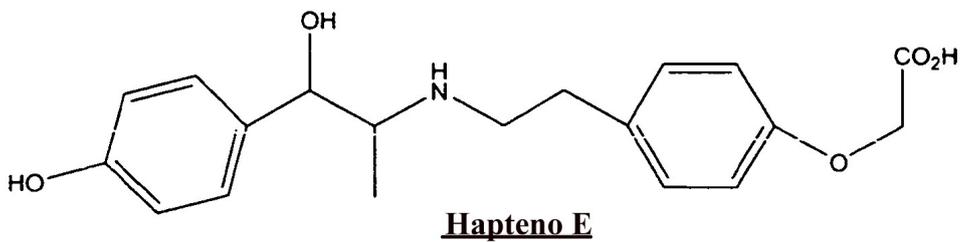
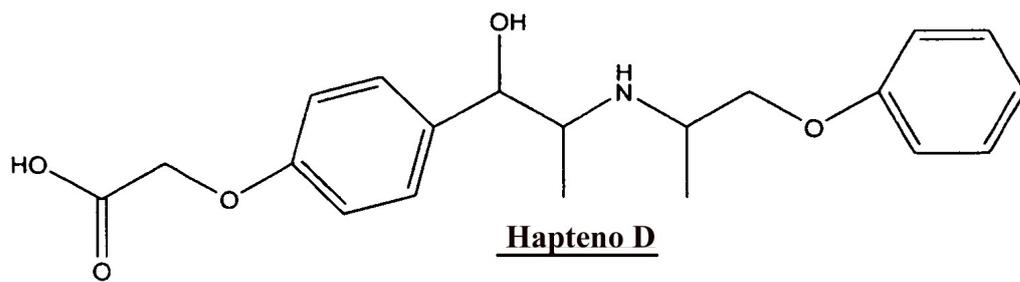
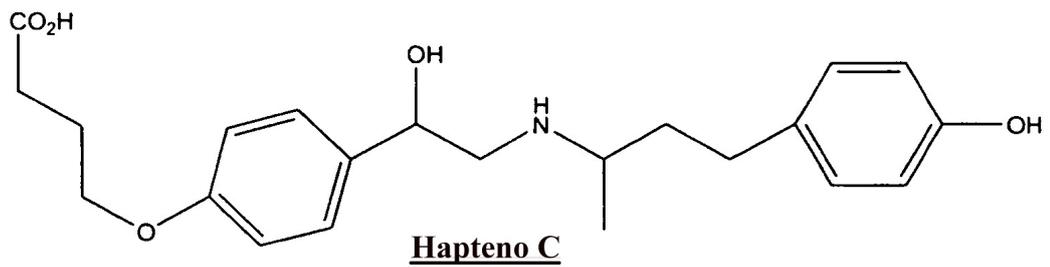
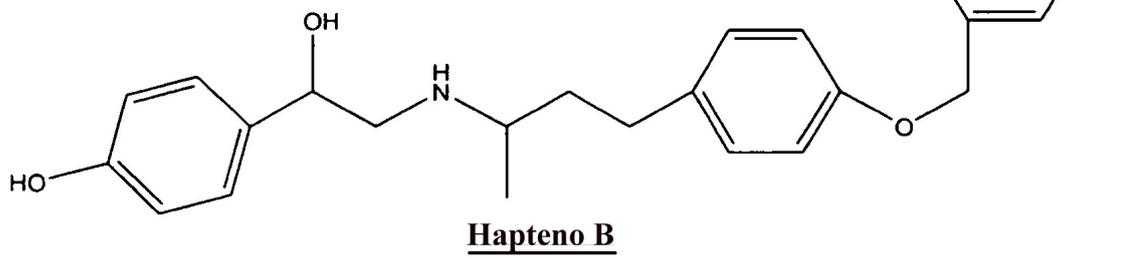
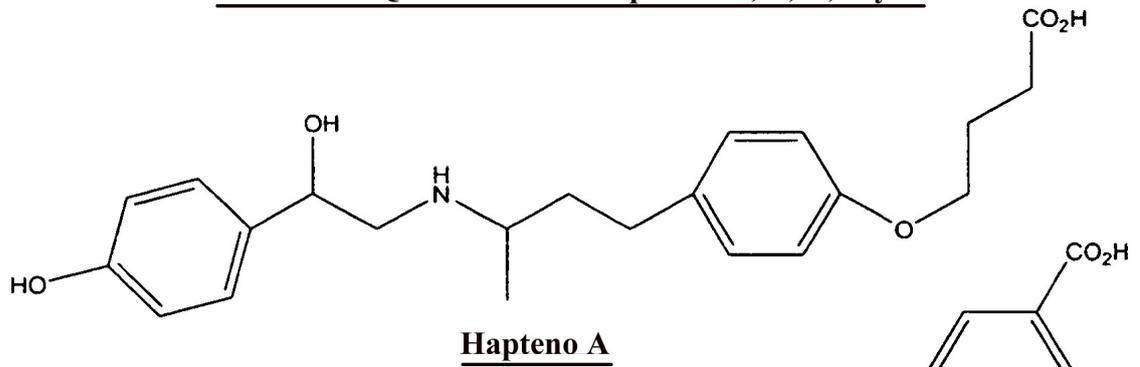


Figura - 2

Reacciones químicas para la preparación del Hapteno A y el Inmunógeno A

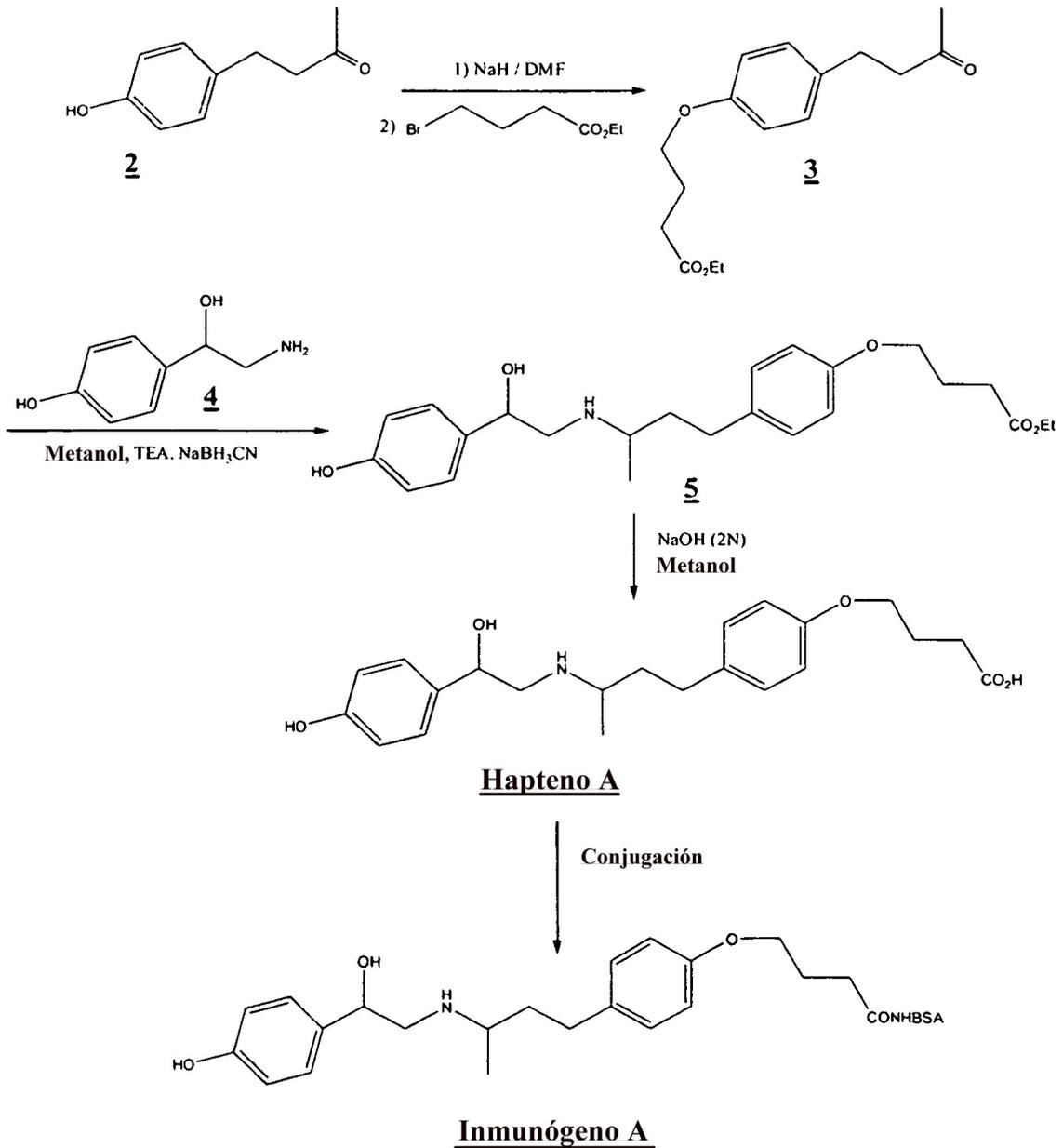


Figura - 3

Reacciones químicas para la preparación del Hapteno B y el Inmunógeno B

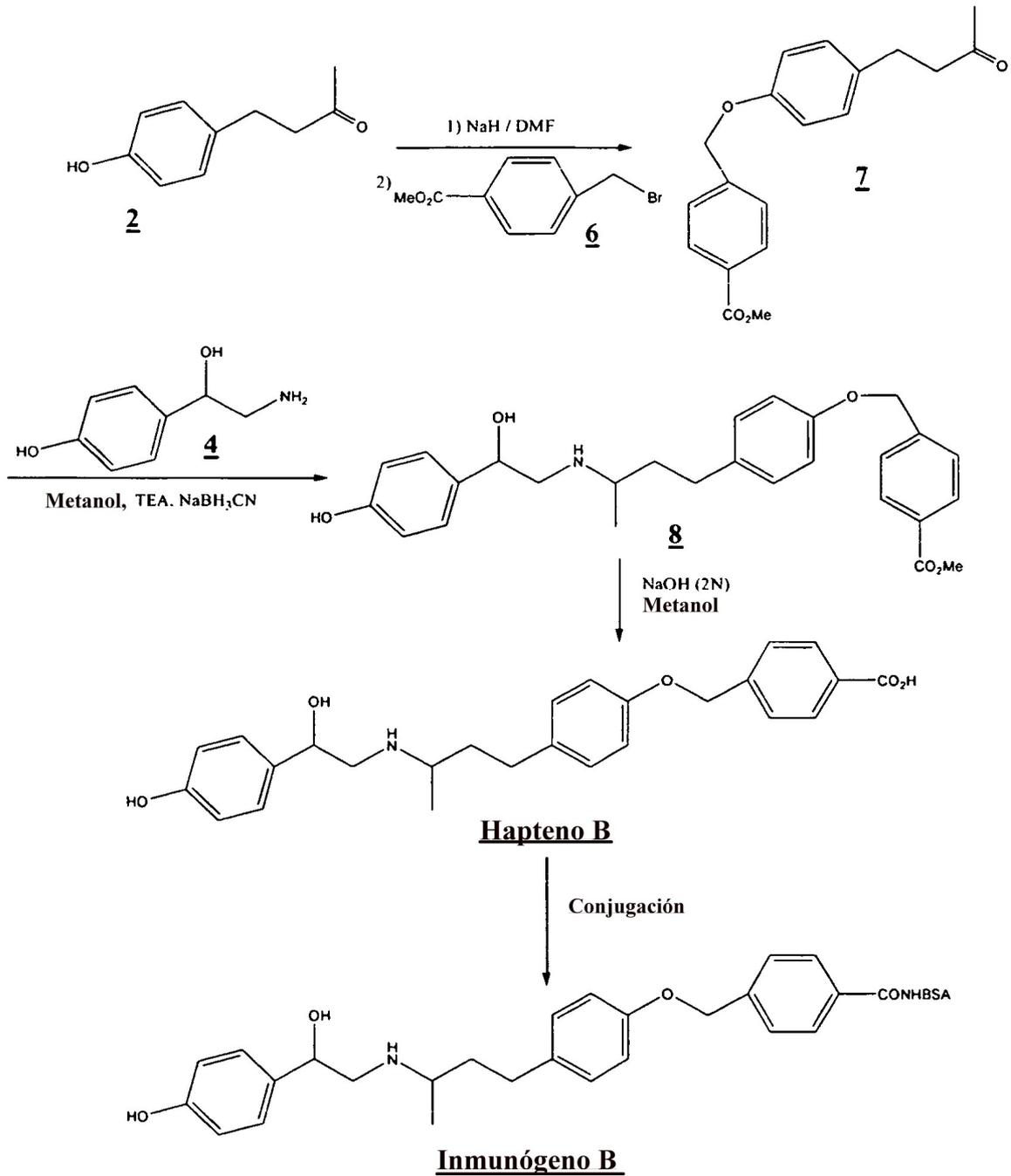


Figura - 4

Reacciones químicas para la preparación del Hapteno C y el Inmunógeno C

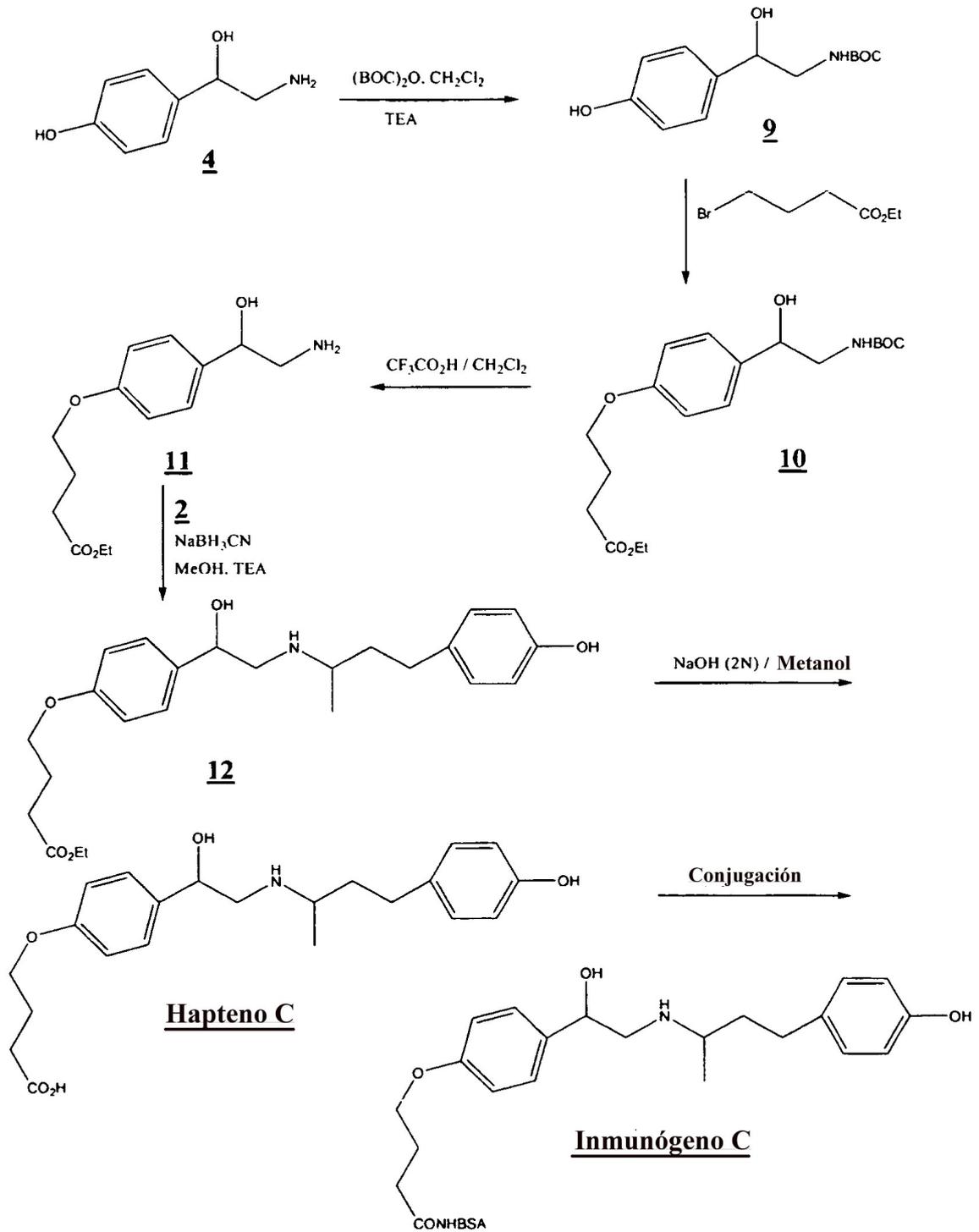


Figura - 5

Reacciones químicas para la preparación de Hapteno D e Inmunógeno D

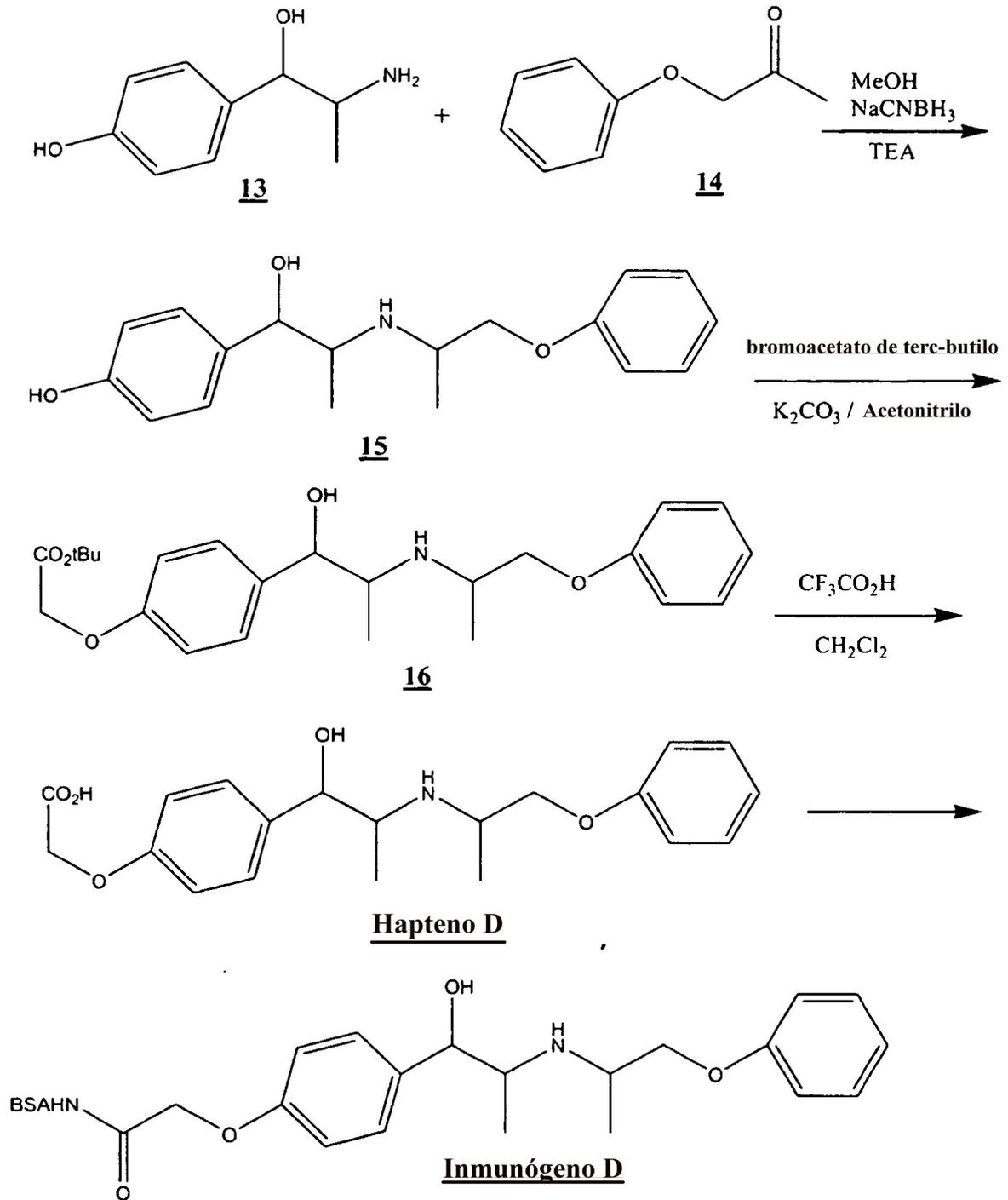


Figura - 6

Reacciones químicas para la preparación del Hapteno E y el Inmunógeno E

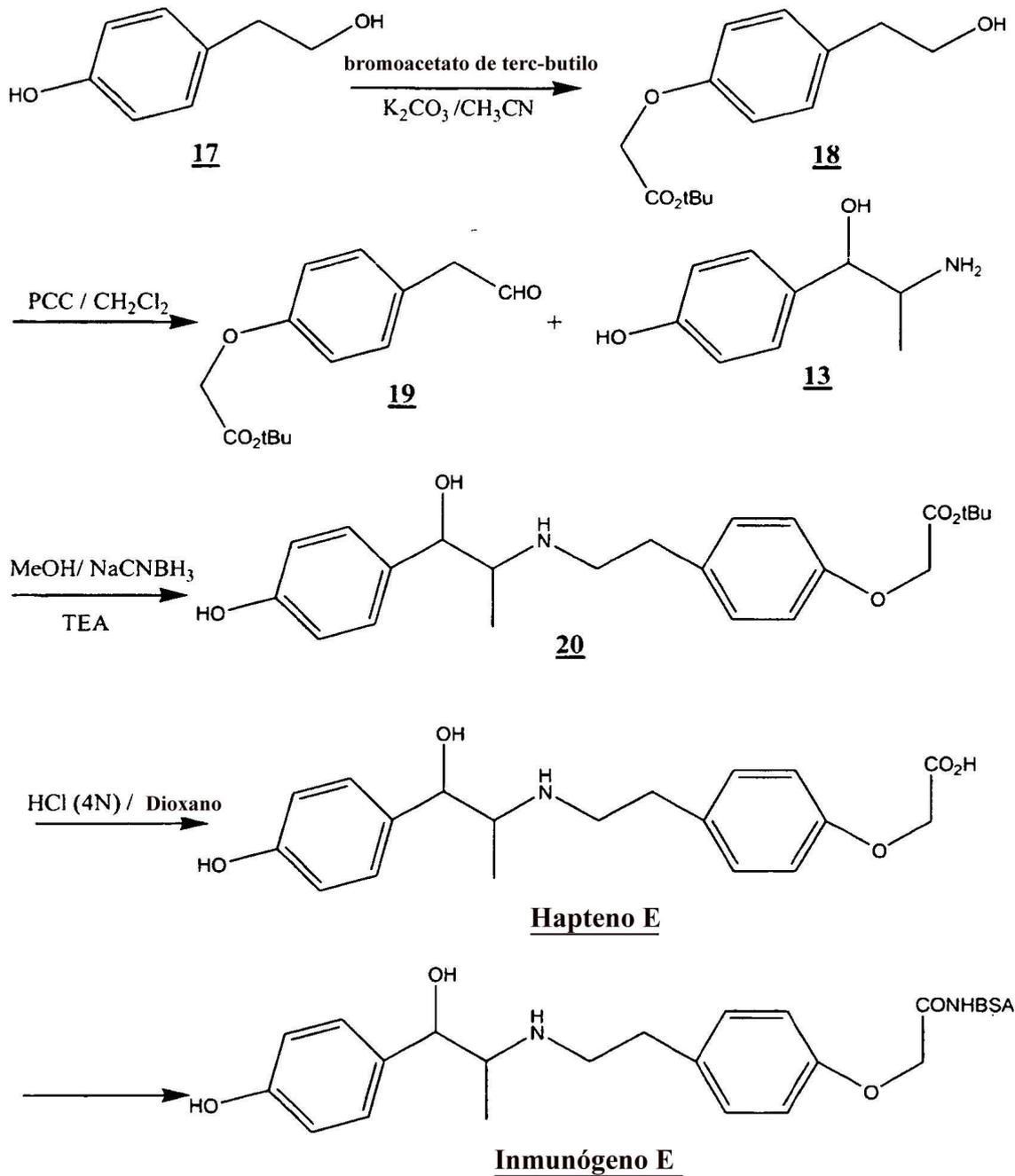


Figura - 7