

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 078**

51 Int. Cl.:

C07C 233/18 (2006.01)

C07C 233/31 (2006.01)

C07C 217/06 (2006.01)

C07D 207/36 (2006.01)

C07C 271/16 (2006.01)

C07C 331/28 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07D 207/404 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2005 E 05825390 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 1828106**

54 Título: **Derivados y conjugados de la metanfetamina para inmunoensayo**

30 Prioridad:

17.12.2004 US 16619

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

13.03.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

HUI, RAYMOND, A. y

VITONE, STEPHEN, S.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 398 078 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

Derivados y conjugados de la metanfetamina para inmunoensayo

5 Campo de la invención

La presente invención generalmente hace referencia al campo de los métodos de inmunoensayo para la determinación de drogas de abuso en muestras biológicas, en particular, a métodos de inmunoensayo para la determinación de drogas anfetamínicas y, más particularmente, de derivados y conjugados de la metanfetamina útiles para tal cuestión.

Antecedentes de la invención

La utilización y abuso de un tipo de drogas de diseño ilegales, comúnmente conocidas como drogas de tipo éxtasis, ha aumentado significativamente en los últimos años. Estos compuestos, que son derivados de la anfetamina que difieren de ésta por tener un sistema de anillo fusionado de metilendioxifenilo, incluyen el MDA (3,4-metilendioxianfetamina), MDMA, también conocido como "éxtasis" (3,4-metilendioxi-N-metilanfetamina), MDEA, también conocido como "Eva" (3,4-metilendioxi-N-etilanfetamina), BDB (3,4-metilendioxifenil-2-butanamina), y MBDB (3,4-metilendioxifenil-N-metilbutanamina).

Hasta ahora, los métodos para la detección de las drogas de tipo éxtasis ha incluido principalmente inmunoensayos originalmente desarrollados para la detección de anfetamina y/o metanfetamina. La detección de una droga de tipo éxtasis mediante tales ensayos se basa en las reacciones cruzadas limitadas que casualmente pueden existir entre la droga de tipo éxtasis y los anticuerpos para la anfetamina y/o metanfetamina. Un resultado positivo en tal ensayo puede no indicar qué sustancia particular o miembro de los derivados de la clase metilendioxi (MD) está presente en la muestra.

En general, los inmunoensayos de anfetamina y metanfetamina son relativamente insensibles y no específicos para las drogas de tipo éxtasis. Particularmente, tales ensayos tienen un reconocimiento limitado del derivado MDEA.

La presente invención está dirigida a remediar estos y otros problemas relacionados con la utilización de los inmunoensayos de anfetamina y/o metanfetamina convencionales para la detección de drogas pertenecientes a la clase metilendioxi o de tipo éxtasis.

En la evaluación de las drogas de abuso, los inmunoensayos, particularmente los inmunoensayos de unión competitiva, han demostrado ser especialmente ventajoso. En los inmunoensayos de unión competitiva un analito en una muestra biológica compite con un reactivo marcado, o un análogo del analito, o un trazador, por un número limitado de lugares de unión receptores en los anticuerpos específicos para el analito y el análogo del analito. Habitualmente, enzimas tales como la β -galactosidasa y la peroxidasa, moléculas fluorescentes tales como compuestos de fluoresceína, compuestos radioactivos tales como el ^{125}I , y micropartículas marcan las sustancias utilizadas como trazadores. La concentración del analito en la muestra determina la cantidad de análogo del analito que se unirá al anticuerpo. La cantidad de análogo del analito que se unirá es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra dado que el analito y el análogo del analito se unen al anticuerpo en proporción a sus concentraciones respectivas. La cantidad de análogo del analito libre o unido puede determinarse mediante métodos adecuados al marcador particular que se utilice.

Actualmente, los ensayos automatizados basados en la interacción cinética de las micropartículas en una solución, medida por los cambios en la transmisión de la luz, son populares. En ausencia de droga en la muestra, el anticuerpo libre se une a unos conjugados de micropartículas de droga, causando la formación de agregados de partículas. Tal y como avanza la reacción de agregación en ausencia de droga en la muestra, la absorbancia aumenta. Cuando una muestra contiene la droga en cuestión, la droga compite con un derivado de la droga unido a una partícula por el anticuerpo libre. El anticuerpo unido a la droga de la muestra deja de estar disponible para promover la agregación de partículas y se inhibe la subsiguiente formación de la red de partículas. La presencia de droga en la muestra disminuye aumentando la absorbancia en proporción a la concentración de la droga en la muestra. El contenido de droga en la muestra se determina en relación al valor obtenido para un límite conocido de concentración de la droga.

Un problema en los ensayos para las drogas de tipo anfetamina es que los métodos previos en la materia no proporcionan suficiente reactividad cruzada y desplazamiento de los anticuerpos para medir todos los analitos de tipo anfetamina en una muestra, especialmente la anfetamina, la metanfetamina, la 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-N-metilanfetamina (MDMA), y 3,4-metilendioxi-N-etilanfetamina (MDEA), con una sensibilidad suficiente. Los derivados de la metanfetamina de la presente invención solucionan tales problemas mediante la provisión de la reactividad cruzada y el desplazamiento de los anticuerpos para la metanfetamina requeridos para la medición sensible de la anfetamina, la metanfetamina, y los compuestos de tipo éxtasis. Otro problema solucionado mediante la presente invención es el relacionado con la conjugación no deseada de los

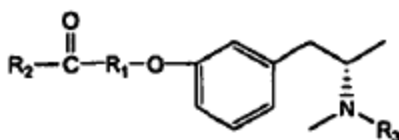
haptenos mediante los grupos amino libres en el hapteno de la metanfetamina. Los derivados de la presente invención evitan este problema.

5 En la patente de EE.UU. 5.135.863 publicada el 4 de agosto de 1992, Hu et al. Describen conjugados que incluyen un marcador unido a un análogo de la anfetamina o la metanfetamina mediante un enlace tiol. Los conjugados también incluyen un enlazante unido al anillo de benceno en posición meta o para, y el nitrógeno de la anfetamina está desprotegido.

10 En la solicitud de patente de EE.UU. 2001/0051158 publicada el 13 de diciembre de 2001, Owens et al. describen haptenos inmunoquímicos que son derivados en posición meta de la metanfetamina. El grupo amino libre del hapteno de la metanfetamina está desprotegido.

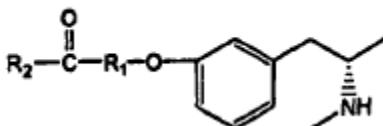
Resumen de la invención

15 Los compuestos de la presente invención son derivados de la metanfetamina que tienen un enlazante alquilo meta-sustituido en el anillo de benceno y un grupo protector en el nitrógeno del hapteno de la metanfetamina. Tales compuestos tienen la estructura



20 en la que R₁ es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos, R₂ es un grupo saliente, y R₃ es un grupo protector, seleccionado a partir del grupo que incluye trifluoroacetilo, terbutiloxicarbonilo y benciloxicarbonilo.

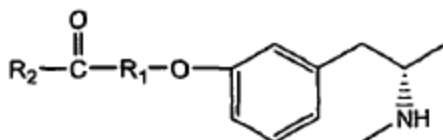
La presente invención también hace referencia a un compuesto con la fórmula



25 en el que R₁ es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos y R₂ es un polisacárido o una micropartícula.

30 La presente invención también hace referencia a un inmunoensayo para la determinación de metanfetamina en una muestra que incluye los pasos de:

(a) combinar una muestra sospechosa de contener metanfetamina con un anticuerpo específico para la metanfetamina y un análogo del analito marcado con la estructura

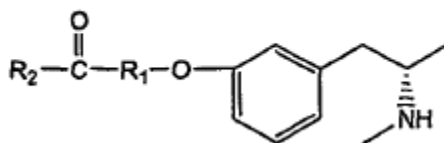


35 en el que R₁ es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos y R₂ es un polisacárido o una micropartícula, por lo que la metanfetamina y el análogo del analito se unen competitivamente al anticuerpo, y

40 (b) determinar la cantidad de análogo marcado unido o no unido al anticuerpo como medición de la metanfetamina en la muestra.

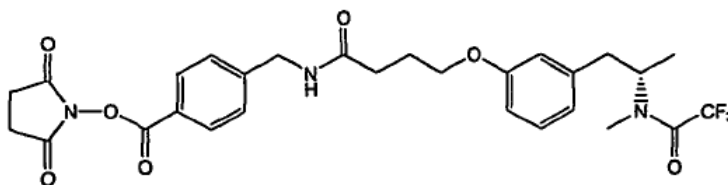
Dentro del ámbito de la presente invención también se incluye un kit de evaluación para su utilización en la determinación de la metanfetamina en una muestra que incluye

- (a) un anticuerpo específico para la metanfetamina y
- (b) un análogo del analito marcado con la estructura



en el que R₁ es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos y R₂ es un polisacárido o una micropartícula.

Un compuesto preferible de la invención es el 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster del ácido 4-[[4-(3-[(S)-2-[metil-(2,2,2-trifluoro-acetil)-amino]-propil]-fenoxi)-butirilamino]-metil]-benzoico, con la estructura



Este compuesto, cuando se conjuga con aminodextrano seguido de la desprotección del grupo N-trifluoroacetato, proporciona un conjugado que, cuando se utiliza en un inmunoensayo donde compite con la metanfetamina libre por la unión a un anticuerpo específico para metanfetamina inmovilizado sobre una micropartícula, proporciona una curva estándar con un buen ajuste con el sistema anfetamina-aminodextrano-anticuerpo correspondiente.

Breve descripción de las ilustraciones

La figura 1 es una representación esquemática que muestra la síntesis del compuesto 1 tal y como se describe en los ejemplos 1 y 2.

Las figuras 2 y 3 son representaciones esquemáticas que muestran la síntesis del compuesto 8 tal y como se describe en los ejemplos 3-8.

La figura 4 es una representación esquemática que muestra la síntesis del compuesto 10 tal y como se describe en los ejemplos 9 y 10.

La figura 5 es una representación esquemática que muestra la conjugación de un compuesto de la presente invención con BSA y la desprotección del nitrógeno para proporcionar el compuesto 11 tal y como se describe en el ejemplo 11.

La figura 6 es una representación esquemática que muestra la conjugación de un compuesto de la presente invención con aminodextrano seguido de la desprotección del grupo N-trifluoroacetato para proporcionar el compuesto 12 tal y como se describe en el ejemplo 16.

La figura 7 es una representación esquemática que muestra la síntesis del compuesto 15 tal y como se describe en el ejemplo 12.

La figura 8 es una representación esquemática que muestra la síntesis del compuesto 17 tal y como se describe en el ejemplo 13.

La figura 9 es una representación esquemática que muestra la síntesis del compuesto 18 tal y como se describe en el ejemplo 14.

La figura 10 es una representación esquemática que muestra la síntesis del compuesto 19 tal y como se

describe en el ejemplo 15.

La figura 11 es una curva de dosis-respuesta generada utilizando el conjugado de aminodextrano 12 de la presente invención con partículas recubiertas con anticuerpos para la metanfetamina.

La figura 12 es una curva de dosis-respuesta generada utilizando el conjugado de aminodextrano 12 de la presente invención con partículas recubiertas con anticuerpos para N-etilamfetamina.

Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta descripción y en las reivindicaciones anejas, deben comprenderse las siguientes definiciones.

El término "hapteno" hace referencia a un antígeno parcial o incompleto. Los haptenos son sustancias libres de proteínas, mayoritariamente sustancias de bajo peso molecular, que no son capaces de estimular la formación de anticuerpos pero que sí reaccionan con los anticuerpos. La anfetamina, la metanfetamina, la metilendioximetanfetamina, y otros compuestos de tipo anfetamina son haptenos.

El término "hapteno activado" hace referencia a un hapteno que se proporciona con un lugar de reacción disponible, por ejemplo, mediante la adhesión de un grupo enlazante que posee una porción reactiva, que puede utilizarse para enlazar el hapteno al transportador, inmunógeno, marcador, trazador u otra porción.

El término "analito" hace referencia a cualquier sustancia o grupo de sustancias de las que se puede determinar la presencia o cantidad. Tal y como se utiliza aquí, el término analito subsume el término "antígeno", que hace referencia a cualquier compuesto que puede unirse a un anticuerpo.

Tal y como se utilizan aquí, los términos "anfetamina" y "drogas de tipo anfetamina" hacen referencia a la anfetamina, la metanfetamina, los análogos anfetamínicos de las metilendioxifenilalquilaminas, también conocidos como anfetaminas de diseño, por ejemplo, la metilendioximetanfetamina (MDMA, también llamada éxtasis), y metabolitos de estas drogas.

El término "derivado" hace referencia a un compuesto químico o molécula hecha a partir de un compuesto padre mediante una o más reacciones químicas.

El término "conjugado" hace referencia a cualquier sustancia formada a partir de la unión de dos partes. Algunos conjugados representativos, de acuerdo con la presente invención, incluyen aquellos formados a partir de la unión de una molécula pequeña y una molécula grande, tal como una proteína. El término conjugado subsume el término "inmunógeno".

Tal y como se utiliza aquí, un "grupo enlazante" o "enlazante" hace referencia a un porción de una estructura química que conecta dos o más sustratos, como haptenos, transportadores, inmunógenos, marcadores, trazadores u otros enlazantes. Un grupo enlazante tiene, al menos, 1 cadena ininterrumpida de átomos diferentes al hidrógeno (u otros átomos monovalentes) que se extiende entre las subestructuras. Los átomos de un grupo enlazante y los átomos de una cadena en un grupo enlazante están conectados entre sí mediante enlaces químicos. Los enlazantes pueden ser cadenas de carbono simples o ramificadas, saturadas o insaturadas. También pueden incluir uno o más heteroátomos en la cadena o en el extremo de la cadena. Con "heteroátomos" se hace referencia a átomos diferentes al carbono escogidos del grupo que incluye oxígeno, nitrógeno y azufre. Los grupos enlazantes también pueden incluir grupos cíclicos o aromáticos como parte de la cadena o como sustitución de uno de los átomos de la cadena.

El número de átomos en el grupo enlazante o en el enlazante se determina mediante el cómputo de los átomos diferentes al hidrógeno. El número de átomos en la cadena del grupo enlazante se determina mediante el cómputo del número de átomos diferentes al hidrógeno a lo largo de la vía más corta entre las subestructuras conectadas. Los grupos enlazantes pueden utilizarse para activar, por ejemplo, proporcionar un sitio disponible en un hapteno para sintetizar un conjugado de un hapteno con un marcador o transportador.

El término "grupo alquilo" hace referencia a cualquier cadena de carbono simple, ramificada, cíclica, saturada o insaturada. Algunos grupos alquilo representativos incluyen los alcanos, los alquenos, los alquinos, los cicloalcanos, los cicloalquenos, los cicloalquinos y las combinaciones de los mismos.

La oración "opcionalmente sustituido" hace referencia a la adhesión opcional de uno o más sustituyentes en un grupo alquilo.

El término "grupo saliente" hace referencia a cualquier porción química de un sustrato que puede desplazarse mediante un reactivo con el que reacciona. Algunos grupos salientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, haluros, mesilatos, alcoxis, sales de amonio cuaternarias, y similares. Los grupos salientes preferibles para la utilización de acuerdo con las realizaciones actualmente preferibles están proporcionados por ésteres

activados, por ejemplo, ésteres de trifluoroetoxi, ésteres de N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenilésteres, pentafluorofenilésteres, imidazolilésteres, y N-hidroxibenzotriazolilésteres, donde la porción que contiene el oxígeno del éster que se adhiere al carbono del carbonilo se desplaza en el curso de la reacción.

El término "grupo protector" hace referencia a cualquier porción que se adhiere a un átomo o centro reactivo para alterar su reactividad habitual. Algunos grupos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los descritos en el tratado titulado Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, de Theodora W. Greene y Peter G.M. Wuts (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1999). En la materia se conocen varios grupos protectores del nitrógeno de las aminas, de entre los cuales el trifluoroacetilo es el grupo protector del nitrógeno preferible en la actualidad. Algunos ejemplos de otros grupos protectores preferibles incluyen t-Boc (terbutiloxicarbonilo) y CBZ (benciloxicarbonilo).

El término "análogo del analito" hace referencia a cualquier sustancia o grupo de sustancias que pueden utilizarse en un inmunoensayo competitivo y que se comportan de forma similar a un analito en relación a la afinidad de unión a un anticuerpo. Algunos análogos del analito representativos incluyen drogas e isómeros de las mismas, derivados de drogas, hormonas, polipéptidos y nucleótidos.

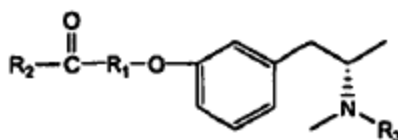
La oración "detección de un analito" hace referencia a cualquier método cuantitativo, semicuantitativo, o cualitativo, así como a otros métodos para la determinación de un analito en general, y un droga anfetamínica en particular. Por ejemplo, un método que solamente detecta la presencia o ausencia de una droga anfetamínica en una muestra se encuentra dentro del ámbito de la presente invención, así como los métodos que proporcionan datos como la cantidad o concentración de la droga en la muestra. Los términos detección, determinación, identificación se utilizan simultáneamente y todos se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

Un "marcador", una "molécula detectora", o un "trazador" es cualquier molécula que produce, o que puede inducirse para producir una señal detectable. El marcador puede conjugarse con un analito, inmunógeno, anticuerpo, o con otra molécula como un receptor o una molécula que puede unirse a un receptor, tal como un ligando, particularmente un hapteno. Algunos ejemplos no limitantes de marcadores incluyen isótopos radioactivos, enzimas, fragmentos de enzima, sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, coenzimas, catalizadores, fluoróforos, tinciones, quimioluminiscentes, luminiscentes, sensibilizadores, partículas no magnéticas o magnéticas, soportes sólidos, liposomas, ligandos y receptores.

El término "kit reactivo" o "kit de evaluación" hace referencia a un conjunto de materiales que se utilizan en la realización de un ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse en combinaciones empaquetadas, en el mismo contenedor o en contenedores separados en relación a sus reactividades cruzadas y estabilidades, y en forma líquida o liofilizada. Las cantidades y proporciones de los reactivos proporcionados en el kit pueden seleccionarse para obtener resultados óptimos para una aplicación particular. Un kit reactivo que incorpora las características de la presente invención incluye anticuerpos específicos para los compuestos anfetamínicos. El kit también puede incluir ligandos del analito y materiales de calibración y control. Los reactivos pueden estar en forma líquida o liofilizados.

La oración "materiales de calibración y control" hace referencia a cualquier material estándar o de referencia que contiene una cantidad conocida de un analito que va a medirse. Una muestra sospechosa de contener un analito y el material de calibración correspondiente se evalúan bajo condiciones similares. La concentración del analito se calcula mediante la comparación de los resultados obtenidos para el espécimen desconocido con los resultados obtenidos para el estándar. Habitualmente, esto se lleva a cabo mediante la creación de una curva de calibración o de dosis-respuesta.

Los compuestos de la presente invención son derivados de la metanfetamina que tienen un enlazante alquilo o alcoxi meta-sustituido en el anillo de benceno y un grupo protector en el nitrógeno. Tales compuestos tienen la estructura



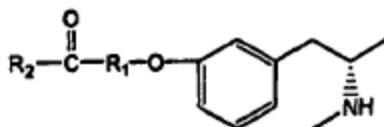
en el que R_1 es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos, R_2 es un grupo saliente, y R_3 es un grupo protector, seleccionado a partir del grupo que incluye trifluoroacetilo, terbutiloxicarbonilo y benciloxicarbonilo. Los derivados contienen un grupo protector en el nitrógeno. Tal grupo protector facilita la reacción de la porción éster activa de los derivados con, habitualmente, aminas de los compuestos transportadores para formar enlaces amida estables sin que interfiera la propia amina del derivado.

Subsiguientemente, el grupo protector se sustrae fácilmente para proporcionar la porción amina desprotegida deseada correspondiente a la amina de la droga libre.

En una realización de la presente invención, R_3 es trifluoroacetilo.

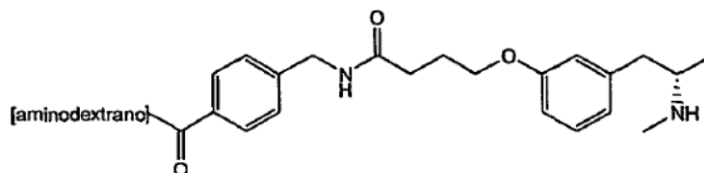
En otra realización de la presente invención, R_2 es un polisacárido o una micropartícula, preferiblemente aminodextrano.

La presente invención también hace referencia a un compuesto con la fórmula



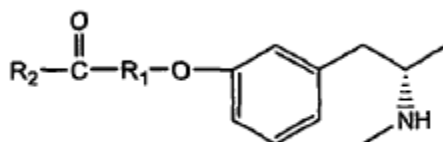
en el que R_1 es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos y R_2 es un polisacárido o una micropartícula, preferiblemente aminodextrano.

Además, la presente invención hace referencia a un compuesto con la fórmula



La presente invención también hace referencia a un inmunoensayo para la determinación de metanfetamina en una muestra que incluye los pasos de:

(a) combinar una muestra sospechosa de contener metanfetamina con un anticuerpo específico para la metanfetamina y un análogo del analito marcado con la estructura



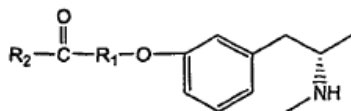
en el que R_1 es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos y R_2 es un polisacárido o una micropartícula, preferiblemente aminodextrano, por lo que la metanfetamina y el análogo del analito se unen competitivamente al anticuerpo, y

(b) determinar la cantidad de análogo marcado unido o no unido al anticuerpo como medición de la metanfetamina en la muestra.

También dentro del ámbito de la presente invención también se incluye un kit de evaluación para su utilización en la determinación de la metanfetamina en una muestra que incluye

(a) un anticuerpo específico para la metanfetamina y

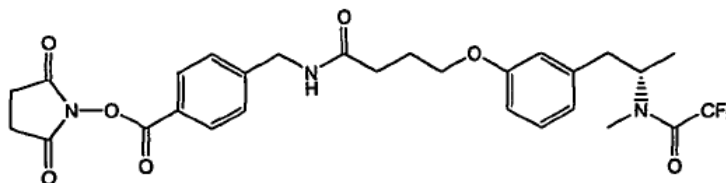
(b) un análogo del analito marcado con la estructura



en el que R_1 es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos, y R_2 es

un polisacárido o una micropartícula, preferiblemente aminodextrano.

Un compuesto preferible de la invención es el 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster del ácido 4-[[4-(3-((S)-2-[metil-(2,2,2-trifluoro-acetil)-amino]-propil)-fenoxi)-butirilamino]-metil]-benzoico, con la estructura



Este compuesto, cuando se conjuga con moléculas transportadoras, tales como el aminodextrano, seguido de la desprotección del grupo N-trifluoroacetato, proporciona un conjugado que, cuando se utiliza en un inmunoensayo donde compite con la metanfetamina libre por la unión a un anticuerpo específico para metanfetamina inmovilizado sobre una micropartícula, proporciona una curva estándar con un buen ajuste con el sistema anfetamina-aminodextrano-anticuerpo correspondiente. La combinación también proporciona reactividades cruzadas adecuadas tanto con los analitos deseados (elevada reactividad cruzada) como con los no deseados (reactividad cruzada baja). Cuando se conjuga con albúmina del suero bovino en una proporción de sustitución baja, tal compuesto también proporciona un conjugado adecuado para la evaluación de los anticuerpos para la metanfetamina.

También se observó que la posición de sustitución y enlace con el éter del grupo enlazante era ventajosa en la moderación de la afinidad del anticuerpo para el conjugado derivado, mientras que la utilización de la porción aminometilbenzoato también ayuda a una caracterización más fácil del derivado (mayor absorbancia UV) así como a una potenciación de la naturaleza sólida de los derivados (de manera opuesta a la gomas o líquidos).

Sorprendentemente se observó que el derivado de la presente invención es reconocido por, al menos, dos anticuerpos formados en respuesta a inmunógenos que estructuralmente son bastante distintos del nuevo derivado. Una diferencia es la posición de sustitución, que es para en los dos inmunógenos pero meta en el conjugado. Otra diferencia es que el enlazante utilizado para los inmunógenos no contiene un átomo de oxígeno en el anillo de benceno, mientras que el conjugado sí. Finalmente, el nitrógeno de los inmunógenos está unido a un grupo metilo mientras que el nitrógeno del conjugado de la invención está unido a un grupo etilo.

Realizaciones específicas

En los ejemplos siguientes, los números en negrita hacen referencia a la estructura correspondiente en las ilustraciones.

Se realizó una cromatografía flash en un gel de sílice 60 (malla de 230-400, EM Science). Se llevó a cabo una cromatografía de capa fina en placas de gel de sílice (0,25 mm, EM Science, Cat # 5717-5) y se visualizó bajo lámparas ultravioleta.

Los disolventes se obtuvieron de J.T. Baker Company a menos que se indique lo contrario. Se utilizaron etilacetato (EtOAc), hexanos (Hex), metanol (MeOH) y cloruro de metileno (CH_2Cl_2) como se recibieron para cromatografía y las intervenciones de reacción. Se obtuvo CH_2Cl_2 seco mediante la ebullición de hidruro de calcio con argón y bajo reflujo. Se obtuvo tetrahidrofurano (THF) seco mediante la ebullición de benzofenona sódica con argón y bajo reflujo. Se obtuvieron dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO) secos en botellas Sure/Seal™ de Aldrich Chemical Company.

Los reactivos y productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Company o de Fluka Chemicals a menos que se especifique lo contrario.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ($^1\text{H-NMR}$) se obtuvieron en un Varian Gemini 2000 (200 MHz) equipado con una estación de trabajo Sun/Sparc. Las rotaciones ópticas se llevaron a cabo en un polarímetro Perkin Elmer 341.

Se prepararon 3N de ácido perclórico mediante la dilución de ácido perclórico al 70% (11,7N).

Los espectros de masa de la cromatografía líquida (CL-EM) y los espectros de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se obtuvieron en un sistema Agilent HP1100 LC/MS equipado con un detector de matriz de diodos y una bomba cuaternaria. Para los espectros/análisis de CL-EM, el flujo cromatográfico se portó después de la columna al detector MSD. A menos que se indique lo contrario, la columna analítica utilizada fue una

columna analítica Vydac 218TP54 (300 Å, 5 µ) equipada con un módulo protector Phenomenex (KJO-4282). A menos que se indique lo contrario, los pases se llevaron a cabo utilizando TFA-MeCN (C) al 0,1% en TFA-H₂O al 0,1% (A) con un gradiente de disolvente de 5% (0 min.) a 100% (20 min.) y de nuevo a 5% (25 min.) de (C) en (A).

5

Ejemplo 1.

Síntesis del compuesto 1, [(S)-2-(3-metoxifenil)-1-metiletil]-((S)-1-feniletil)-amina

- 10 Una solución de 6,0 g (0,0365 moles) de 3-metoxifenilacetona (Trans World Chem.) y 4,47 g (0,0369 moles) de S-(-)-α-feniletilamina (Fluka) en 100 ml de benceno (Acros) se trató con 6,0 g de tamices moleculares de 4Å y se calentó hasta reflujo durante 3 h. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en 100 ml de etanol absoluto (Aldrich), se colocó en una botella Parr de 500 ml que contiene 2,4 g de níquel Raney (suspendido al 50% en H₂O) y se hidrogenó a 50 PSI durante 24 h. El catalizador se filtró a través de CELITE y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en 800 g de gel de sílice utilizando metanol-CH₂Cl₂ al 3% como eluyente para producir 5,0 g de producto en forma de un aceite amarillo pálido. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible; CL-EM: t_R 11,4 min., M+H observado 270,2; [α]_D -36,6° (589 nm, c=1, CHCl₃).

- 20 Ejemplo 2.

Síntesis del compuesto 2, (S)-2-(3-metoxifenil)-1-metiletilamina

- 25 Una botella Parr de 500 ml de cargó con 550 mg de Pd/C al 10% y una solución de 5,0 g (0,0186 moles) del compuesto 1 en 100 ml de metanol, y se hidrogenó a 50 PSI durante 48 h. El catalizador se filtró a través de CELITE y el filtrado se concentró a presión reducida hasta conseguir un aceite amarillo. Éste se purificó mediante cromatografía flash en una columna corta de gel de sílice (4 cm de anchura, 5 cm de altura) utilizando metanol-CH₂Cl₂ al 10% para sustraer el catalizador residual y producir 2,84 g de aceite amarillo. Éste se disolvió en CH₂Cl₂ y se filtró para sustraer el gel de sílice residual, luego se concentró a presión reducida y se bombeó a alto vacío durante la noche para producir 2,5 g de aceite amarillo. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible; CL-EM: t_R 8,05 min. (Chiralcel OD-RH, Daicel Chemical Industries; gradiente de 5% (en el min. 0) a 85% (en el min. 17,5) de TFA/acetonitrilo al 0,1% en TFA/agua al 0,1%; velocidad de flujo de 0,5 mL/min.), M+H observado 166,1, un pico; HPLC: t_R 30,0 min (d-isómero), 33,7 min (1-isómero), proporción d/1=97,2/2,8 a 200 nm (Crownpak CR(+), Daicel Chemical Industries; 1 ml/min isocrático de ácido perclórico acuoso a pH 1,35 (~0,2%) que contiene MeOH al 5%); [α]_D +31,7° (589 nm, c=1, CHCl₃).

35

Ejemplo 3.

Síntesis del compuesto 3, 2,2,2-trifluoro-N-[(S)-2-(3-metoxifenil)-1-metiletil]-acetamida

40

- Se refrigeró una solución de 2,4 g (0,0145 moles) de compuesto 2 en 24 ml de piridina (Aldrich) con argón a -20°C, se trató con una solución de 3,2 ml de anhídrido trifluoroacético en 36 ml de éter (E. M. Science) y se agitó a -20°C durante 15 min. Se extrajo la mezcla con 3 x 100 ml de etilacetato. Los extractos de etilacetato combinados se lavaron con 2 x 150 ml de solución salina saturada, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida para producir 3,79 g de un sólido amarillo. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible.

45

Ejemplo 4.

Síntesis del compuesto 4, 2,2,2-trifluoro-N-[(S)-2-(3-hidroxi-fenil)-1-metiletil]-acetamida

50

- Una bomba de presión que contiene 3,77 g (0,0144 moles) del compuesto 3 y 70,0 g (0,6057 moles) de piridina·HCl se purgó con argón y se calentó a 210°C durante 45 min. Los sólidos se fundieron y se hicieron homogéneos. Se dejó refrigerar la mezcla de la reacción mezcla, momento en el que se solidificó. El sólido se disolvió en H₂O y se vertió en 400 ml de agua helada. Éste se extrajo con 5 x 250 ml de CH₂Cl₂. Los extractos de CH₂Cl₂ se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida, luego se bombearon a alto vacío durante la noche para producir 3,34 g de aceite amarillo. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible; CL-EM compatible.

55

- En otro pase, la reacción similar de 320 mg del compuesto 3 y 5,94 g de clorhidrato de piridina en una bomba de presión dio, tras un tratamiento similar, 213 mg del compuesto 4 que presentaba: ¹H-NMR compatible; CL-EM: t_R 11,4 min, M+H observado 248,1, M+Na 270,1.

60

Ejemplo 5.

- 65 Síntesis del compuesto 5, 4-{3-[(S)-2-(2,2,2-trifluoroacetilamino)-propol]-fenoxi}-butirato de etilo

Una mezcla de 1,08 g (0,027 moles) de NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) y 10 ml de DMF anhidro (Aldrich) con argón se trató con una solución de 3,3 g (0,0133 moles) del compuesto 4 en 33 ml de DMF anhidro (Aldrich) añadidos gota a gota durante un periodo de 5 min. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min., luego se trató con 3,4 ml (0,0238 moles) de etil-4-bromobutirato (Fluka) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió en 250 ml de 1M de tampón fosfato potásico con pH 7, y entonces se extrajo con 2 x 250 ml de etilacetato. Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con 2 x 150 ml de 1M de tampón fosfato potásico con pH 7, se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en 250 g de gel de sílice utilizando EtOAc/hexano al 30% como eluyente para producir un aceite amarillo pálido que cristalizó al reposar para producir 3,9 g de un sólido blanco. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible; CL-EM: t_R 15,7 min, M+H observado 362,1, M+H₂O 379,1, M+Na 384,1,

Ejemplo 6.

Síntesis del compuesto 6 4-(3-((S)-2-[metil-(2,2,2-trifluoroacetilo)-amino]-propil)-fenoxi)-butirato de etilo,

Una solución de 3,8 g (0,0105 moles) del compuesto 5 en 72 ml de DMF anhidro (Aldrich) con argón se trató con 9,5 ml (0,1526 moles) de yodometano y 11,74 g (0,0507 moles) de óxido de plata (I), y se agitó a 40°C durante la noche. La mezcla se filtró a través de CELITE, la torta de filtración se lavó con 450 ml de etilacetato, y el filtrado se filtró de nuevo para extraer un precipitado blanco. El filtrado se lavó con 2 x 250 ml de H₂O. Los lavados con H₂O se combinaron y se extrajeron con 200 ml de etilacetato. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se concentraron a presión reducida y se bombearon a alto vacío para producir 3,84 g de aceite amarillo pálido. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible, proporción de rotámeros ~2:1.

Ejemplo 7.

Síntesis del compuesto ácido 7, 4-(3-((S)-2-[metil-(2,2,2-trifluoroacetilo)-amino]-propil)-fenoxi)-butírico

Una solución de 3,8 g (0,0101 moles) del compuesto 6 en 50 ml de THF destilado se trató con 50 ml de 3N ácido perclórico (preparado con ácido perclórico al 70% de Aldrich) y se calentó a 50°C durante 4 h. La mezcla se refrigeró y se extrajo con 2 x 200 ml de etilacetato. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con 4 x 200 ml de H₂O, 2 x 200 ml de solución salina saturada, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se concentraron a presión reducida y se bombearon a alto vacío durante la noche para producir 3,5 g de aceite amarillo pálido. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible, proporción de rotámeros ~2:1.

Ejemplo 8.

Síntesis del compuesto 8, 4-(3-((S)-2-[(2,2-dimetil-propionilo)-metil-amino]-propil)-fenoxi)-butirato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

Una solución de 3,5 g (0,0101 moles) del compuesto 7 en 220 ml de CH₂Cl₂ anhidro con argón se trató con 1,4 g (0,0122 moles) de NHS y 2,4 g (0,0125 moles) de EDC (Sigma) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se lavó con 200 ml de HCl 0,1N, 2 x 200 ml de H₂O, 2 x 200 ml de solución de NaHCO₃ saturada, 200 ml de solución salina saturada, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida para producir 4,42 g de aceite claro. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible, proporción de rotámeros ~3:2.

Ejemplo 9.

Síntesis del compuesto 9, ácido 4-[[4-(3-((S)-2-[metil-(2,2,2-trifluoroacetilo)-amino]-propil)-fenoxi)-butirilamino]-metil]-benzoico

Una mezcla de 1,6 g (0,0106 moles) de ácido 4-aminometilbenzoico en 60 ml de H₂O y 120 ml de THF destilado se trató con 10 ml de NaOH 1N. Entonces, la solución resultante se trató con una solución de 4,4 g (0,01 moles) del compuesto 8 en 120 ml de THF destilado. Entonces, la reacción se trató con 4 ml de NaOH 1N, añadiendo 1 ml cada vez para mantener el pH a 9. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El THF se extrajo a presión reducida y el residuo acuoso se neutralizó hasta un pH de 6 con HCl 2N. Éste se extrajo con 2 x 250 ml de etilacetato. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida para producir 4,65 g de un sólido blanco. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible, proporción de rotámeros ~3:2.

Ejemplo 10.

Síntesis del compuesto 10, 4-[[4-(3-((S)-2-[metil-(2,2,2-trifluoroacetilo)-amino]-propil)-fenoxi)-butirilamino]-metil]-benzoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

Una solución de 1,0 g (0,002 moles) del compuesto 9 en 100 ml de CH₂Cl₂ anhidro con argón se trató con 300

mg (0,0026 moles) de NHS y 480 mg (0,0025 moles) de EDC (Sigma) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se lavó con 100 ml de 0,1N HCl, 2 x 100 ml de H₂O, 2 x 100 ml de una solución saturada de NaHCO₃, 100 ml de solución salina saturada, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida para producir 1,13 g de un sólido amorfo blanco. ¹H-NMR (CDCl₃) compatible, proporción de rotámeros ~3:2; CL-EM: t_R 14,5 min, M+H observado 578,2, M+Na 600,2; [α]_D +15,7° (589 nm, c=1, CHCl₃).

Ejemplo 11.

Síntesis del compuesto 11, 4-(3-((S)-2-[(2,2-dimetil-propionilo)-metilamino]-propil)-fenoxi)-butirato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo desprotegido conjugado con BSA

Una solución de 1,0 g de albúmina sérica bovina (BSA; fracción V de Pentex; Miles Inc., Kankakee, IL, EE.UU.) en 16 ml de 50 mM de fosfato potásico (KPi) pH 7,5 se refrigeró en una baño de hielo y se trató con 22 ml de DMSO añadidos gota a gota lentamente. Tras completar la adición, se añadió una solución de 13,4 mg del compuesto 8 en 2 ml de DMSO gota a gota y se dejó que la reacción alcanzase la temperatura ambiente con agitación. De forma similar, también se preparó una muestra de 100 mg de BSA en 1,6 ml de 50 mM KPi pH 7,5 y 2,4 ml de DMSO, pero no se añadió ningún hapteno. Tras la agitación durante la noche, tanto la reacción como la muestra de referencia se transfirieron separadamente a un tubo de diálisis (SpectraPor 7; límite de peso molecular de 10.000) y se dializaron contra DMSO al 60% - 50mM de KPi, pH 7,5 (dos veces a temperatura ambiente/4h cada uno; una vez a temperatura ambiente durante la noche) y entonces secuencialmente contra DMSO al 40%, al 20% y al 10% - 50 mM de KPi, pH7,5, y luego contra 50mM de KPi pH7,5. La diálisis se continuó contra 50 mM de carbonato potásico (cuatro cambios) a temperatura ambiente durante 4 días para desproteger el grupo trifluoroacetilo, y luego contra 50mM de KPi pH7,5 a ~ 4°C durante varios días (seis cambios). Los retentados se recubrieron para proporcionar el conjugado 11 en forma de una solución grisácea (68 ml), así como el BSA de referencia. El ensayo proteico con azul de Coomassie utilizando el BSA de referencia [concentración proteica mediante UV] para generar a curva estándar, indicó 14,0 mg/ml de proteína para el conjugado 11.

Ejemplo 12.

Síntesis del compuesto 15, [2-(3-((S)-2-[metil-(2,2,2-trifluoroacetilo)-amino]-propil)-fenoxi)-etil]-carbamato de terc-butilo

Compuesto 13, 2,2,2-trifluoro-N-[(S)-2-(3-metoxifenil)-1-metiletil]-N-metilacetamida. Una solución de 3,84 mg del compuesto 3 en 10 ml de dimetilformamida seca (DMF) con argón se trató con 1,33 ml de yodometano y 1,64 g de óxido de plata (I) y se agitó a 40°C durante la noche. La mezcla se filtró a través de CELITE y la torta de filtración se lavó con etilacetato. El filtrado se filtró de nuevo para extraer un precipitado blanco. El filtrado se lavó con 2 x 250 ml de H₂O. Los lavados acuosos se combinaron y se extrajeron con 50 ml de etilacetato. Las porciones de etilacetato se combinaron, se secaron con sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para producir 330 mg de aceite amarillo. Éste se cromatógrafió en 50 g de gel de sílice utilizando CH₂Cl₂ como eluyente para producir 220 mg del producto, el compuesto 13, en forma de aceite amarillo pálido. CL-EM: t_R 15,4 min, M+H observado 276,0, M+Na 298,0.

Compuesto 14, 2,2,2-trifluoro-N-[(S)-2-(3-hidroxi-fenil)-1-metiletil]-N-metilacetamida. Una mezcla de 220 mg del compuesto 13 y 3,87 g de clorhidrato de piridina se calentó a 210°C en una bomba de presión durante 1 h. La masa fundida resultante se dejó refrigerar y se disolvió en agua. Ésta se extrajo con 5 x 50 ml de CH₂Cl₂. Los extractos de CH₂Cl₂ combinados se secaron con sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para producir 100 mg del compuesto 14 en forma de un aceite amarillo. CL-EM: t_R 12,9 min, M+H observado 262,0, M+Na 284,0.

Compuesto 15. Una solución de 25 mg del compuesto 14 en 10 ml de acetona seca se trató con una solución de 2-(BOC-amin)etilbromuro en 1 ml de DMF seca, 77 mg de carbonato potásico anhidro, y una cantidad catalítica de 18-corona-6. La mezcla se calentó a 60°C durante la noche. La mezcla se refrigeró y se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó 3 veces con H₂O, se secó con sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida hasta producir un aceite rojo que contenía el compuesto 15. CL-EM: t_R 16,5 min, M+Na observado 427,1.

Ejemplo 13.

Síntesis del compuesto 17

El compuesto 15 se trató con ácido trifluoroacético y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida para producir el compuesto amina 16.

Una solución de NHS-éster del ácido bifenil-di-carboxílico, el compuesto 20 (Ghoshal et al., patente de EE.UU. 6.794.496), en THF seco con argón se trató con una solución de 1 equivalente del compuesto 16 en THF seco con 2 equivalentes de trietilamina añadida gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la

noche. La mezcla se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía proporciona el compuesto 17.

Ejemplo 14.

Síntesis del compuesto 18

Una solución de di-(N-hidroxisuccinimida)-éster del ácido tereftálico, el compuesto 21 (Ghoshal *et al.*, Solicitud de patente europea 1.148.339) en THF seco con argón se trató con una solución de 1 equivalente del compuesto 16 en THF seco con 2 equivalentes de trietilamina añadida gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía proporciona el compuesto 18.

Ejemplo 15.

Síntesis del compuesto 19

Una solución de cloruro de 4-isotiocianatobenzoilo, compuesto 22 (Ghoshal *et al.*, patente de EE.UU. 6.794.496), en THF seco con argón se refrigeró con un baño de hielo y se trató con una solución de 1 equivalente del compuesto 16 en THF seco con 2 equivalentes de trietilamina añadida gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía proporciona el compuesto 19.

Ejemplo 16.

Ensayo utilizando el conjugado de la presente invención con anticuerpos de la metanfetamina

El conjugado metanfetamina-aminodextrano, compuesto 12, se preparó de la siguiente manera: se disolvieron noventa mg de aminodextrano en 5 ml de DMSO. Se disolvieron diez mg del compuesto 10 en 1 ml de DMSO, se añadieron gota a gota a la solución del transportador de polímeros y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se colocó en un tubo de diálisis con un límite de peso molecular de 10.000 (Pierce Snakeskin™) y se dializó en 1 litro de DMSO al 80% durante la noche a temperatura ambiente. Entonces, se dializó utilizando un gradiente decreciente en un litro de DMSO al 60%, 1 litro de DMSO al 40%, 1 litro de DMSO al 20%, 4 litros de agua desionizada, durante al menos 3 h cada uno, a temperatura ambiente. Entonces se dializó con 1 litro de 100 mM de K₂CO₃, se ajustó el pH a 13 con KOH, durante 2 días con 4 cambios del tampón. Un paso final de diálisis incluyó 4 litros de agua desionizada durante, al menos, 2 días con 4 cambios. Entonces se liofilizó el conjugado.

Entonces se preparó un reactivo conjugado, a pH 7,1, que contenía 0,125 mg/ml de conjugado de metanfetamina 12, 144 mM de sal disódica del ácido piperacín-1,4-bis(2-etansulfónico), 31 mM de ácido piperacín-1,4-bis(2-etansulfónico), BSA al 0,1% (peso/volumen), azida sódica al 0,09% (peso/volumen) y ácido poliacrílico al 1,5% (peso/volumen).

Se preparó un reactivo anticuerpo-micropartícula de la siguiente manera: se incubaron 100 ml de 50 mg/ml de anticuerpo monoclonal específico para la metanfetamina con 100 ml de partículas de látex de 0,201 µm al 1% en 50 mM de tampón MES, pH 6,5, durante la noche a temperatura ambiente. Las partículas se bloquearon con 10 ml de 100 mg/ml de BSA en 50 mM de tampón MES, pH 6,5, durante 2 horas. El látex se lavó con 50 mM de tampón MOPS, pH 7,1, utilizando un sistema de filtrado de flujo tangencial. Este anticuerpo se generó en respuesta al inmunógeno descrito en la patente de EE.UU. 5.501.987 (columna 3, estructura 2, donde la proteína es tiroglobulina bovina).

Entonces se preparó un reactivo de micropartículas con pH 7,1, que incluye micropartículas sólidas recubiertas con anticuerpos al 0,1%, 25 mM de ácido 3-morfolinopropansulfónico, 25 mM de ácido 3-morfolinopropansulfónico, sal sódica, BSA al 0,1% (peso/volumen) y azida sódica al 0,09% (peso/volumen).

El ensayo se llevó a cabo en un analizador Roche/Hitachi 917. Se pipetearon diez ml de muestra en una cubeta e inmediatamente se siguió con la adición de 180 ml del reactivo conjugado (R1). La mezcla se incubó durante ~90 segundos, y se añadieron 80 ml del reactivo de micropartículas (R2) a la cubeta. La mezcla de la reacción se incubó a 37°C durante aproximadamente 8 min., tiempo durante el cual se monitorizó la reacción de aglutinación de las partículas a 505 nm. Se elaboró una curva estándar en base a una medición en dos tiempos tras la adición de R2.

Se determinó el porcentaje de reactividad cruzada en un inmunoensayo. Se estableció una curva estándar utilizando cantidades conocidas del analito de metanfetamina diana. Se analizaron cantidades conocidas de varias drogas relacionadas con la anfetamina como muestras en el inmunoensayo, y se generaron concentraciones aparentes de estas drogas a partir de la curva estándar. El porcentaje de reactividad cruzada de

esta droga es la concentración aparente de la droga, dividida por la concentración real y multiplicada por 100. La curva estándar (dosis-respuesta) así generada se muestra en la figura 11.

- 5 La reactividad cruzada entre la partícula recubierta con metanfetamina y el conjugado 12 se muestra en la tabla siguiente.

Compuesto	Conc. (ng/ml) evaluada	Resultado	% Reactividad cruzada
d-pseudoefedrina	100.000	326	0,3
1-efedrina	100.000	197	0,2
Tiramina	100.000	169	0,2
Fentermina	100.000	113	0,1
BDB	2.000	69	3
MBDB	1.000	467	47
MDA	600	38	6
d-anfetamina	800	36	5
1-metanfetamina	8.000	798	10
MDEA	1.000	144	14
MDA	900	526	58
PPA	100.000	59	0,1
Fendimetracina	100.000	913	0,9

- 10 Estos resultados muestran una buena reactividad cruzada no sólo para la d-metanfetamina sino también para los compuestos de tipo éxtasis como la MDMA y la MBDB. La reactividad cruzada con los compuestos de interferencia comunes, tales como la efedrina, la pseudoefedrina, la fentermina y la tiramina, fue mínima, es decir, menor al 1%.

Ejemplo 17.

- 15 Ensayo utilizando el conjugado de la presente invención con anticuerpos para la N-etilamfetamina

El reactivo conjugado se preparó tal y como se describe en el ejemplo 16.

- 20 Se preparó una micropartícula recubierta con anticuerpos tal y como se describe en el ejemplo 16, utilizando el anticuerpo monoclonal NEAMP 48,2 descrito en la patente de EE.UU. 2004/0077021. Entonces se preparó un reactivo de micropartículas tal y como se describe en el ejemplo 16.

El ensayo se llevó a cabo en un analizador Roche/Hitachi 917, tal y como se describe en el ejemplo 16.

- 25 Se determinó el porcentaje de reactividad cruzada en un inmunoensayo. Se estableció una curva estándar utilizando cantidades conocidas del analito de metilendioxietilamfetamina (MDEA) diana. Se analizaron cantidades conocidas de varias drogas relacionadas con la amfetamina como muestras en el inmunoensayo, y se generaron concentraciones aparentes de estas drogas a partir de la curva estándar. El porcentaje de reactividad cruzada de esta droga es la concentración aparente de la droga, dividida por la concentración real y multiplicada por 100. La curva estándar (dosis-respuesta) así generada se muestra en la figura 12.
- 30

La reactividad cruzada entre la partícula recubierta con el anticuerpo y el conjugado 12 se muestra en la tabla siguiente.

Compuesto	Conc. (ng/ml) evaluada	Resultado	% Reactividad cruzada
d-anfetamina	5.000	0	0,0
d-metanfetamina	1.000	89	8,9
1-metanfetamina	12.500	68	0,5
MDMA	1.000	46	4,6
MDA	5.000	37	0,7

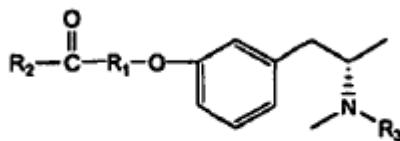
Compuesto	Conc. (ng/ml) evaluada	Resultado	% Reactividad cruzada
MBDB	1.000	59	5,9
BDB	5.000	47	0,9
PPA	200.000	70	0,04
1-efedrina	200.000	91	0,05
d-pseudoefedrina	200.000	113	0,06
Fentermina	200.000	103	0,05
Fendimetracina	100.000	44	0,04
Tiramina	200.000	67	0,03

Estos resultados muestran una buena reactividad cruzada no sólo para la metilendioxietilamfetamina sino también para los compuestos de tipo éxtasis como la MDMA y la MBDB. A su vez, la reactividad cruzada con los compuestos de interferencia comunes, tales como la efedrina, la pseudoefedrina, la fentermina y la tiramina, fue básicamente nula.

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con la fórmula



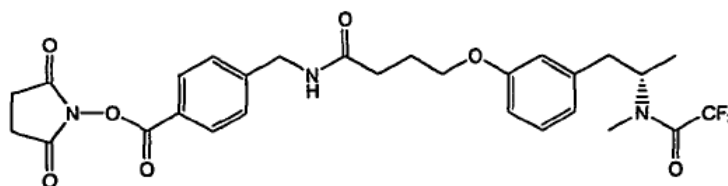
en el que R₁ es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos, R₂ es un grupo saliente, y R₃ es un grupo protector seleccionado a partir del grupo que incluye trifluoroacetilo, terbutiloxicarbonilo y benciloxicarbonilo.

2. El compuesto de reivindicación 1, en el que R₃ es trifluoroacetilo.

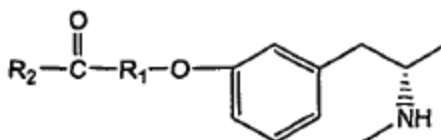
3. El compuesto de reivindicación 1, en el que R₂ es un polisacárido o una micropartícula.

4. El compuesto de reivindicación 3, en el que R₂ es aminodextrano.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, con la fórmula 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster del ácido 4-[[4-(3-((S)-2-[metil-(2,2,2-trifluoro-acetil)-amino]-propil)-fenoxi)-butirilamino]-metil]-benzoico, con la estructura



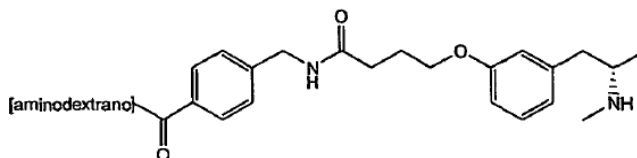
6. Un compuesto con la fórmula



en el que R₁ es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos y R₂ es un polisacárido o una micropartícula.

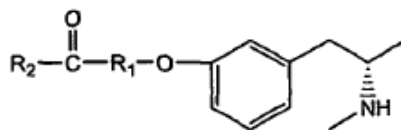
7. El compuesto de reivindicación 6, en el que R₂ es aminodextrano.

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, con la fórmula



9. Un inmunoensayo para la determinación de metanfetamina en una muestra que incluye los pasos de:

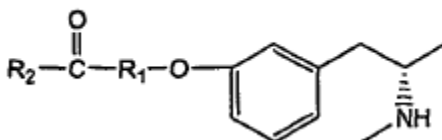
(a) combinar una muestra sospechosa de contener metanfetamina con un anticuerpo específico para la metanfetamina y un análogo del analito marcado con la estructura



en el que R_1 es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos y R_2 es un polisacárido o una micropartícula, donde la metanfetamina y el análogo del analito se unen competitivamente al anticuerpo, y

- 5 (b) determinar la cantidad de análogo marcado unido o no unido al anticuerpo como medición de la metanfetamina en la muestra.
10. El inmunoensayo de la reivindicación 9, en el que R_2 es aminodextrano.
- 10 11. Un kit de evaluación para su utilización en la determinación de la metanfetamina en una muestra que incluye
- (a) un anticuerpo específico para la metanfetamina y
- (b) un análogo del analito marcado con la estructura

15



en el que R_1 es un enlazante alquilo que contiene 2-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos y R_2 es un polisacárido o una micropartícula.

- 20 12. El kit de evaluación de la reivindicación 11, en el que R_2 es aminodextrano.

Figura 1

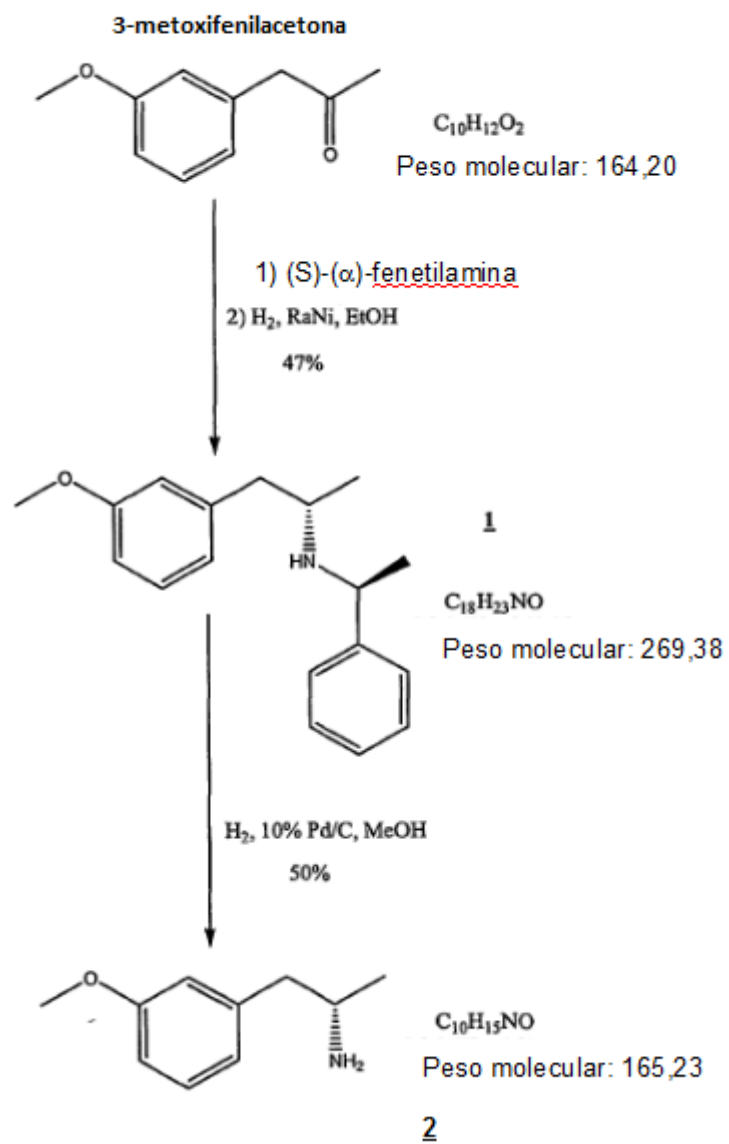


Figura 2

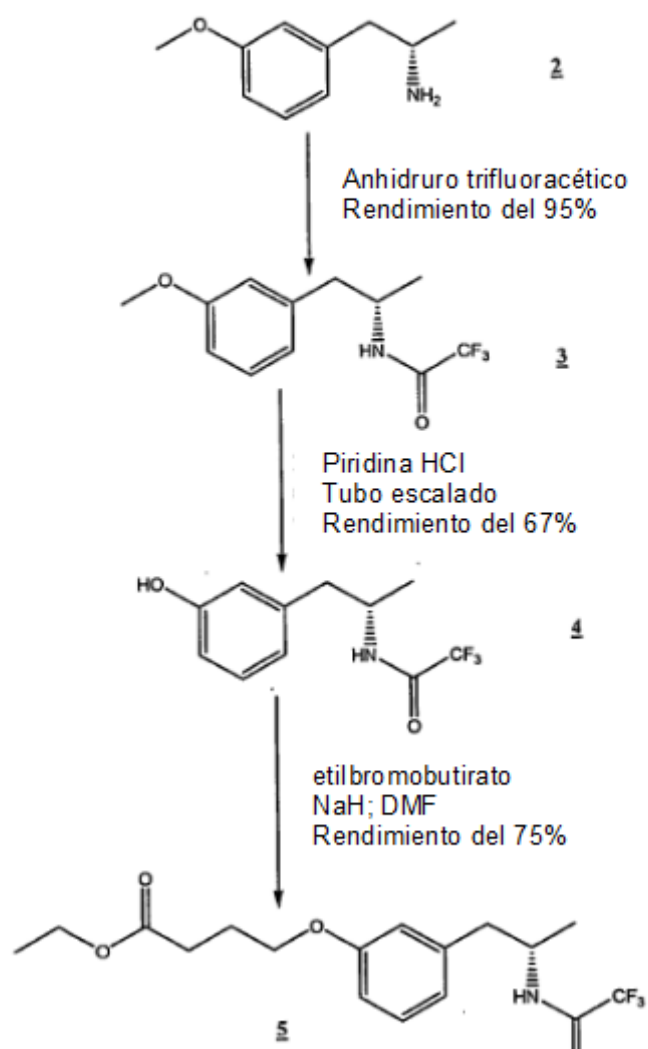


Figura 3

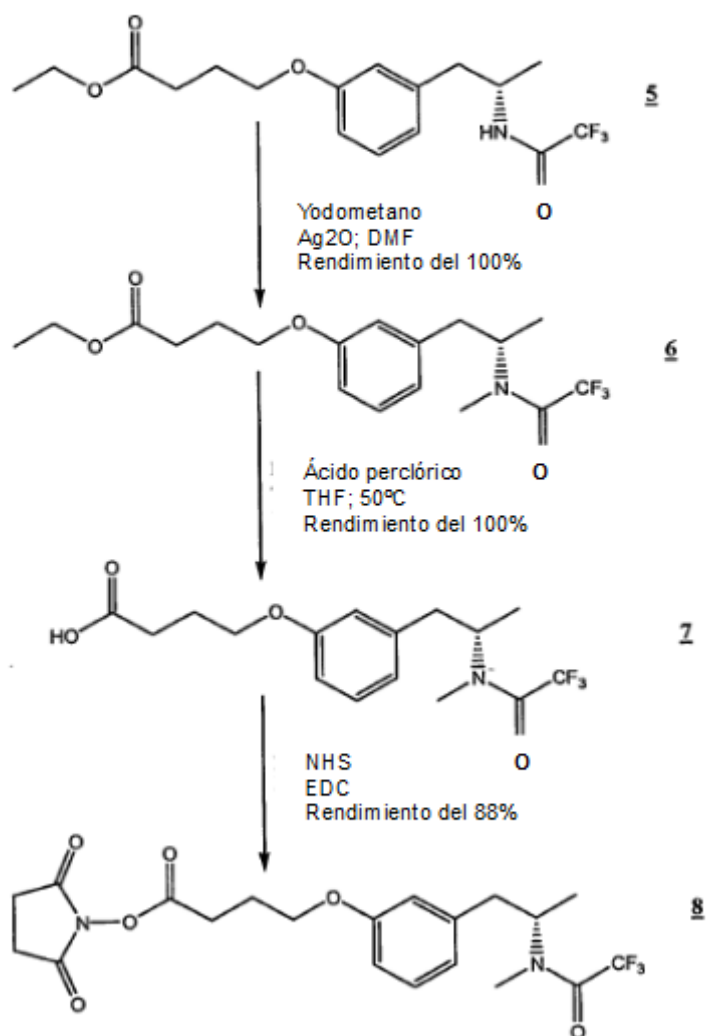


Figura 4

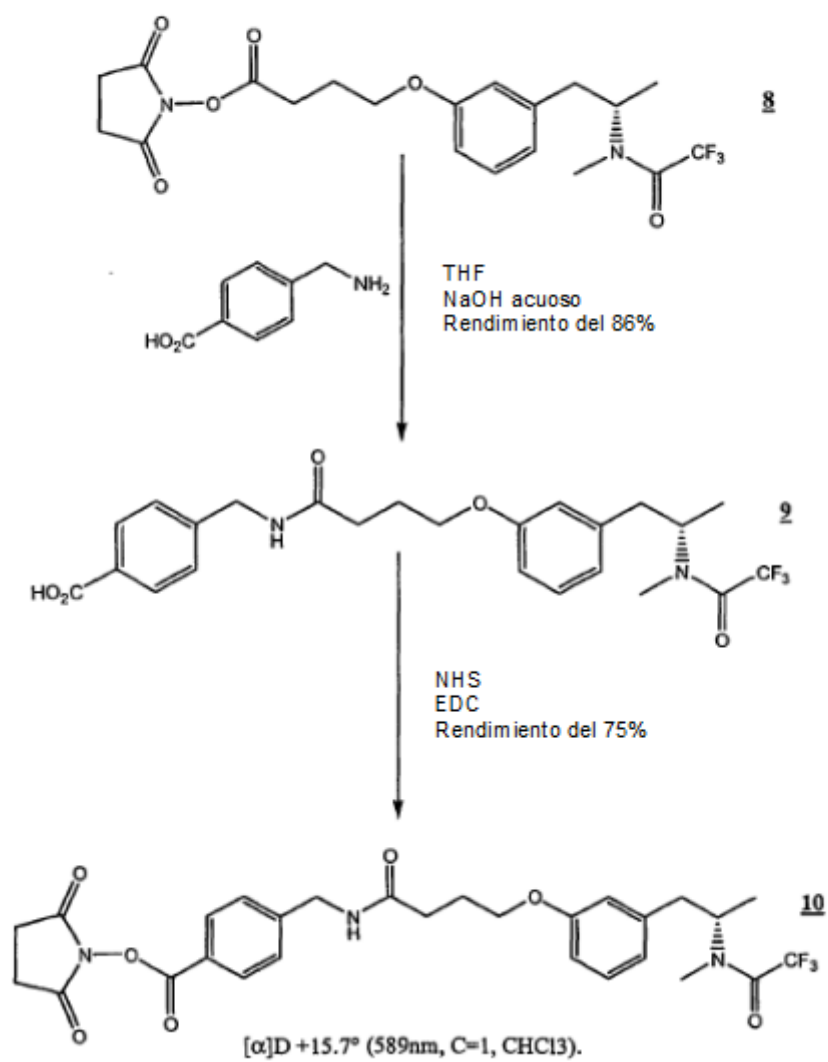


Figura 5

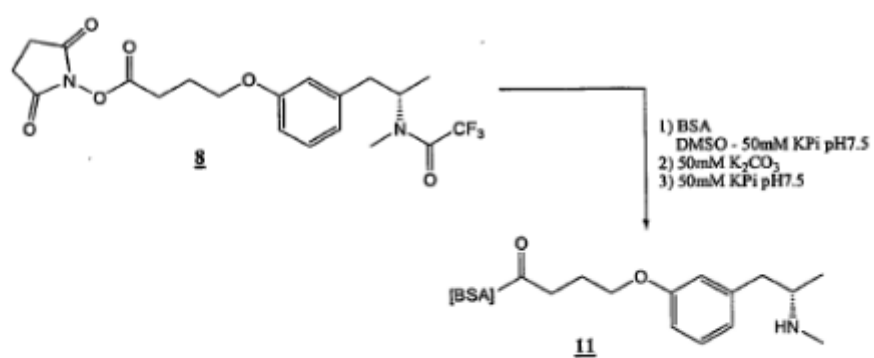


Figura 6

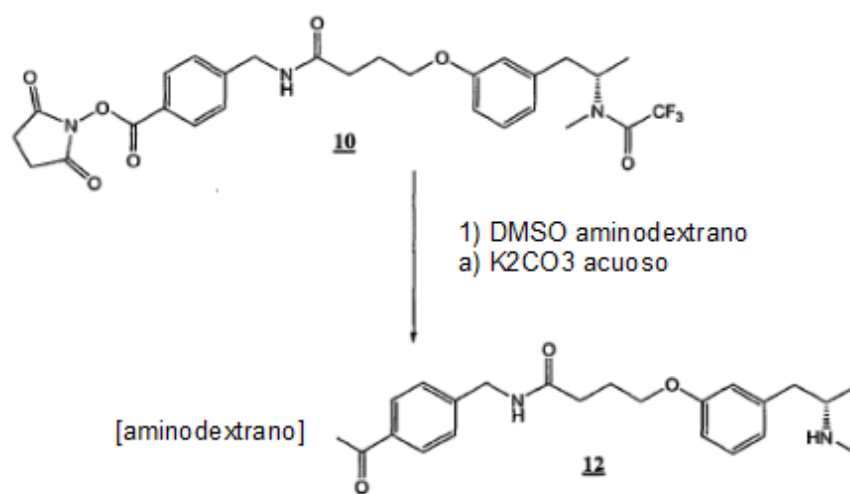


Figura 7

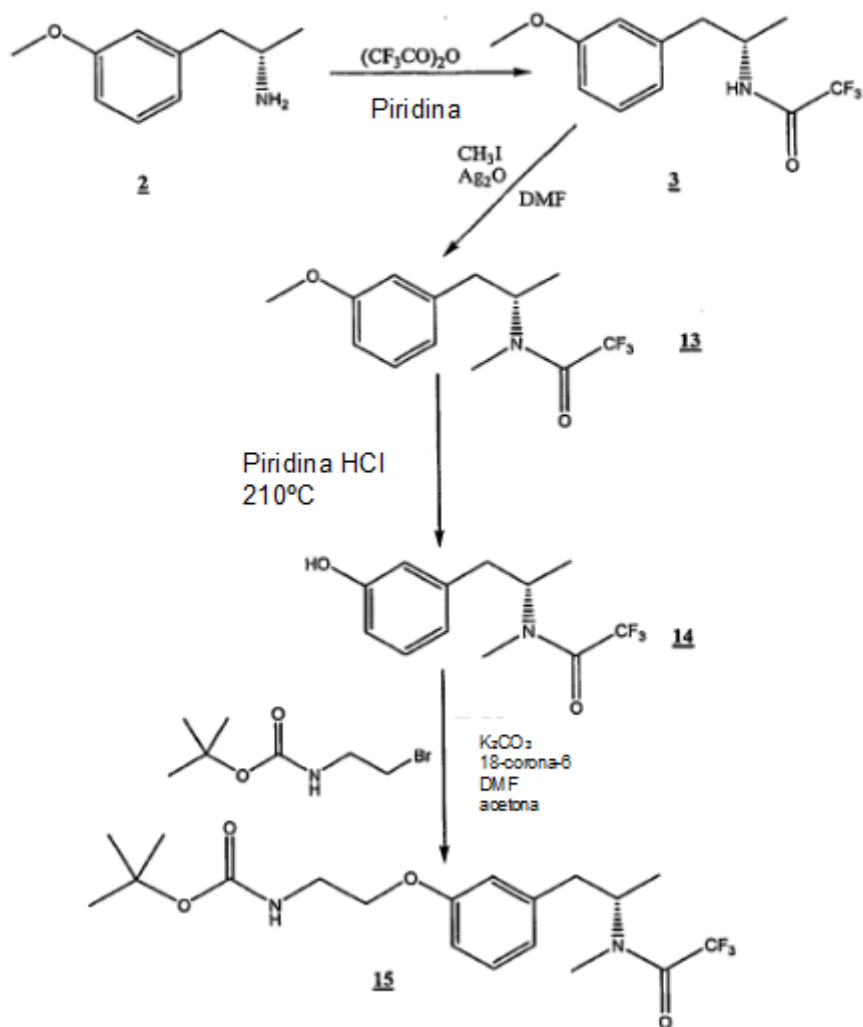


Figura 8

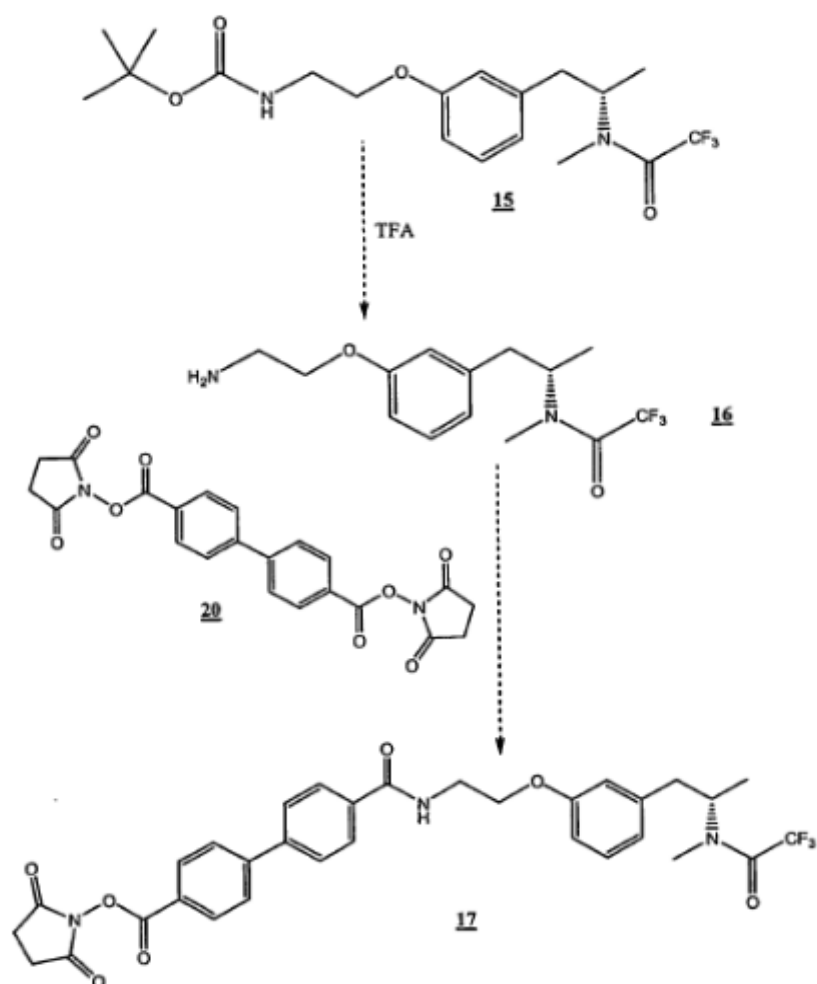


Figura 9

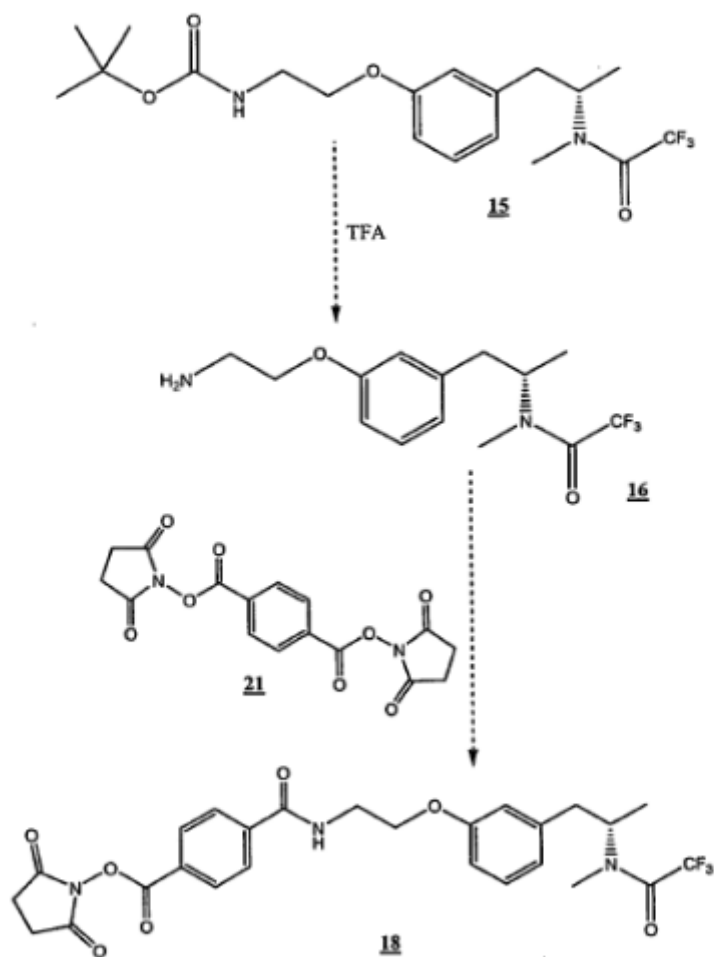


Figura 10

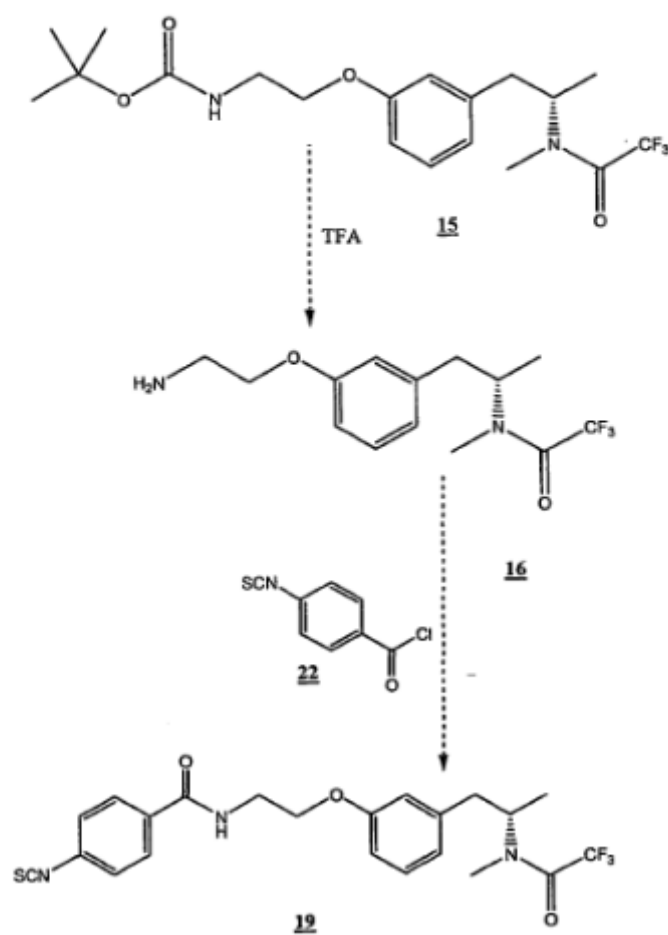


Figura 11

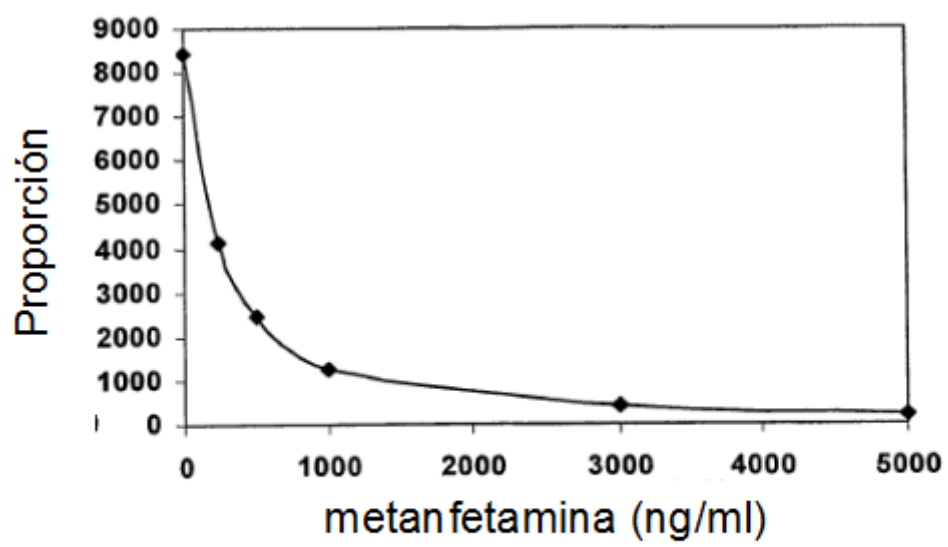


Figura 12

