

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 655**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2007 E 07798645 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2032602**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales que reconocen selectivamente Metanfetamina y compuestos similares a Metanfetamina**

30 Prioridad:

15.06.2006 US 813917 P

20.04.2007 US 913124 P

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

26.07.2013

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ARKANSAS (100.0%)
2404 North University Avenue
Little Rock, AR 72207 , US**

72 Inventor/es:

**OWENS, MICHAEL, S;
GUNNELL, MELINDA;
CARROLL, IVY, F;
CHI, YINGNI;
HENRY, RALPH y
PETERSON, ERIC**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 415 655 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

Anticuerpos monoclonales que reconocen selectivamente Metanfetamina y compuestos similares a Metanfetamina

5 **Derechos gubernamentales****Campo de la invención**

10 **[0001]** La invención proporciona anticuerpos monoclonales que reconocen (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina ((+)MDMA), pero no reconocen (-)metanfetamina, (-)anfetamina o (-)MDMA.

Antecedentes de la invención

15 **[0002]** El abuso de (+)metanfetamina ((+)METH) se ha convertido en la amenaza de drogas número uno de América (NACO, 2005). Todas las estrategias conocidas para combatir el uso de las drogas de (+)metanfetamina tienen inconvenientes. Las presentes farmacoterapias para controlar el sistema cardiovascular agudo, sistema nervioso central y efectos tóxicos son habitualmente auxiliares (Sato, 1992; Albertson y col., 1999; Richards y col., 1999); y no hacen nada para eliminar la droga de sus sitios de acción en el cerebro. También faltan medicaciones que puedan reducir o tratar los efectos médicamente incapacitantes de la adicción a (+)METH. Los anticuerpos
20 proporcionan una posible medicación atractiva que puede elegir como diana la droga en lugar del sitio de acción (Kosten y Owens, 2005). Estas medicaciones basadas en proteínas de alta afinidad actúan de los llamados antagonistas farmacocinéticos, secuestrando la droga en la circulación sanguínea de tejidos médicamente vulnerables como el cerebro y corazón.

25 **[0003]** A diferencia de la nicotina y la cocaína en las que los efectos se producen por un único compuesto específico, drogas como los opiáceos (por ejemplo, morfina), arilciclohexilaminas (por ejemplo, fenciclidina) y anfetaminas (por ejemplo, (+)METH) son estructuras de partida a partir de las cuales pueden sintetizarse muchos compuestos farmacológicamente similares. Estas llamadas “drogas de diseño” pueden modificarse químicamente para alterar sus efectos. Así, para que un anticuerpo tenga la aplicabilidad médica más amplia debe tener alta
30 afinidad y especificidad por más de un miembro médicamente importante de esta clase de drogas (es decir, (+)METH, (+)anfetamina ((+)AMP) y (+)MDMA).

[0004] Hay otros asuntos del diseño de medicaciones que adicionalmente complican el desarrollo de tratamientos eficaces para estimulantes similares a (+)METH. Primero, la (+)METH es una de las varias drogas estimulantes con efectos similares o solapantes. En particular, la (+)AMP es tanto un metabolito farmacológicamente activo de (+)METH como una droga frecuentemente usada que podría sustituirse por (+)METH. A continuación, la (+/-)3,4-metilendioximetanfetamina es la mezcla racémica comúnmente denominada MDMA o éxtasis. El isómero positivo ((+)MDMA) tiene predominantemente actividad dopaminérgica similar a estimulante con efectos solapantes con (+)METH, mientras que la (-)MDMA tiene efectos predominantemente serotoninérgicos (Cho y Segal, 1994). (+)METH,
40 (+)AMP y (+)MDMA pueden producir efectos potencialmente mortales a altas dosis (Cho y Segal, 1994; Farre y col., 2004). Adicionalmente, todas estas drogas son estereoisómeros positivos, teniendo los isómeros negativos un perfil farmacológico de efectos significativamente diferente, algunos de los cuales pueden ser beneficiosos. Por ejemplo, la (-)metanfetamina se usa comúnmente como broncodilatador en medicaciones de venta sin receta. Los isómeros negativos de estas drogas podrían ser posiblemente intencionadamente tomados por drogadictos para neutralizar
45 medicaciones de mAb con alta afinidad de unión por tanto estereoisómeros positivos como negativos. De una forma relacionada, hay muchos compuestos estructuralmente similares como efedrina y pseudoefedrina que podrían usarse para reducir la eficacia de anticuerpos si el anticuerpo no es altamente específico por estructuras similares a (+)METH.

50 **[0005]** Hay una necesidad en la materia de anticuerpos específicos que reconozcan al menos una o más de (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA, y que no reaccionan sustancialmente de forma cruzada con (-)metanfetamina, (-)anfetamina o (-)MDMA. En particular, existe la necesidad de anticuerpos monoclonales específicos que reconozcan cada compuesto del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, y que no reaccionen sustancialmente de forma cruzada con (-)metanfetamina, (-)anfetamina o (-)MDMA.

55

Referencia a las figuras en color

[0006] El archivo de la solicitud contiene al menos una fotografía realizada en color. Copias de la presente publicación de solicitud de patente con fotografías en color serán proporcionadas por la oficina a petición y pago de
60 la tasa necesaria.

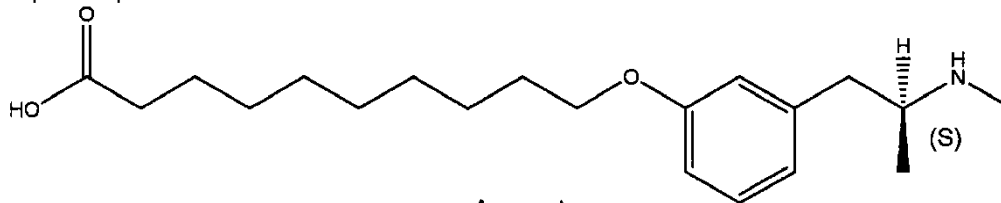
Breve descripción de las figuras

[0007] La **Fig. 1** representa las estructuras químicas de (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina ((+)MDMA).

- [0008]** La **Fig. 2** presenta los alineamientos de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cinco mAb anti-(+)METH y anti-(+)METH/(+)AMP, y anti-(+)METH/(+)AMP/(+)MDMA de afinidad moderada a alta (en la presente memoria, mAb se refiere a anticuerpos monoclonales, tanto en singular como en plural). El Panel A presenta las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas. El Panel B presenta las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras. Las secuencias se presentan en la notación de aminoácidos de una sola letra y se numeran según Kabat y Wu (1991 J Immunol 147:1709-1719). Se indica la localización de los residuos de la región estructural (FR) y región determinante de la complementariedad (CDR) para las cadenas pesadas y las cadenas ligeras.
- 10 **[0009]** La **Fig. 3** presenta modelos moleculares de tres mAb anti-(+)METH. Panel superior: Estereovista de modelos moleculares superpuestos de mAb anti-(+)METH. Se modelaron las regiones variables de los tres mAb, se alinearon estructuralmente y se representaron en formato de dibujo. Los residuos de la región estructural se representan en azul. Las CDR están coloreadas según mAb: mAb6H4, azul; mAb6H8, rojo; mAb4G9, verde. Están marcadas la cadena pesada, la cadena ligera y CDR. Panel inferior: Desviaciones de la raíz cuadrada media (RMSD) (A) de CDR de la conformación de cadena principal de mAb6H4.
- 15 **[0010]** La **Fig. 4** ilustra estructuras modeladas de las cadenas variables de mAb anti-(+)METH. En este modelo, METH (magenta) se ha acoplado molecularmente informáticamente en un bolsillo en la superficie de separación de las cadenas VH y VL con el software FlexX. Paneles izquierdos: Representación de superficie tridimensional del bolsillo profundo en mAb6H4 y mAb4G9. El dominio de la cadena VL está a la izquierda en azul y el dominio de la cadena VH está a la derecha en verde. Paneles derechos: Representación de varillas de mAb6H4 y mAb4G9. Sólo se muestran cadenas laterales dentro de 8 angstroms de la molécula de METH por claridad. La vista está orientada en un "vista desde arriba" con el mismo esquema de color que en el panel izquierdo. Las cadenas laterales están marcadas y numeradas en el esquema de Kabat como en la Figura 2.
- 20 **[0011]** La **Fig. 5** presenta una gráfica que representa concentración en suero de (+)METH con el tiempo. Concentraciones de (+)METH antes (símbolo □ con "M" dentro) y después del tratamiento (símbolos blancos) con cinco mAb anti-(+)METH diferentes (n=3 ratas/momento de tiempo) y concentraciones de (+)AMP antes (símbolo □ con "A" dentro) y después del tratamiento (círculos rellenos) con mAb4G9. Las concentraciones de (+)AMP (círculos rellenos) se muestran sólo para mAb4G9 debido a que los otros cuatro mAb no produjeron aumentos a largo plazo en las concentraciones de (+)AMP. La recta de ajuste óptimo se determinó usando un modelo farmacocinético de dos compartimentos ponderado.
- 25 **[0012]** La **Fig. 6** presenta gráficas que representan el efecto de mAb4G9 sobre la discriminación de METH (Panel A) y la auto-administración de AMP (Panel B) en ratas. (A) Se entrenaron ratas para discriminar cocaína y METH y luego se les administró mAb4G9. Entonces se determinaron las curvas de respuesta a dosis de discriminación de droga para METH. (B) Auto-administración de (+)AMP antes y después del tratamiento con mAb4G9 (3-4 ratas/momento de tiempo). Se usan líneas discontinuas para mostrar los agrupamientos de respondedores a (+)AMP antes y después de mAb.
- 30 **[0013]** La **Fig. 7** representa dos gráficas que muestran el efecto de mAb6H4 (Panel A) y mAb4G9 (Panel B) sobre concentraciones de METH (círculos rellenos) y AMP (círculos blancos) en suero de rata. METH se infundió usando una minibomba osmótica subcutánea y, una vez se alcanzaron las concentraciones en estado estacionario, se administró mAb anti-METH. Las ratas se sacrificaron en diversos momentos de tiempo para la determinación de concentraciones de METH y AMP en suero. Se usó ANOVA unilaterial, seguido de una prueba de Dunnett, para comparar valores de METH y AMP de control y post-mAb. mAb6H4 aumentó significativamente las concentraciones en suero de METH a 1, 5, 30, 75 y 120 min, pero no a las 24 h, en comparación con los niveles de pre-mAb. Las concentraciones de AMP aumentaron brevemente en los momentos de tiempo 1 y 5 min. mAb4G9 aumentó significativamente las concentraciones en suero de METH y AMP de 1 min a 24 h.
- 35 **[0014]** La **Fig. 8** representa dos gráficas que muestran el efecto de mAb6H4 (Panel A) y mAb4G9 (Panel B) sobre las concentraciones de METH (círculos rellenos) y AMP (círculos blancos) en cerebro de rata. METH se infundió usando una minibomba osmótica subcutánea y, una vez se alcanzaron las concentraciones en estado estacionario, se administró mAb anti-METH. Las ratas se sacrificaron en diversos momentos de tiempo para la determinación de concentraciones de METH y AMP en cerebro. Se usó ANOVA unilaterial, seguido de una prueba de Dunnett, para comparar valores de METH y AMP de control y post-mAb. Los niveles en cerebro de METH significativamente diferentes de los grupos de no mAb grupo se indican con *, mientras que # indica niveles de METH y AMP significativamente diferentes del grupo de no mAb. Las concentraciones en el cerebro de METH disminuyeron en todo momento excepto 24 h después del tratamiento con mAb6H4. mAb6H4 no tuvo efecto sobre las concentraciones en el cerebro de AMP. mAb4G9 disminuyó significativamente las concentraciones en el cerebro de METH en todos los momentos de tiempo, mientras que las concentraciones en el cerebro de AMP disminuyeron significativamente en los momentos de tiempo 5 y 30 min.
- 40 **[0015]** La **Fig. 9** representa dos gráficas que muestran el efecto de mAb6H4 (Panel A) y mAb4G9 (Panel B) sobre las concentraciones de METH (círculos rellenos) y AMP (círculos blancos) en cerebro de rata. METH se infundió usando una minibomba osmótica subcutánea y, una vez se alcanzaron las concentraciones en estado estacionario, se administró mAb anti-METH. Las ratas se sacrificaron en diversos momentos de tiempo para la determinación de concentraciones de METH y AMP en cerebro. Se usó ANOVA unilaterial, seguido de una prueba de Dunnett, para comparar valores de METH y AMP de control y post-mAb. Los niveles en cerebro de METH significativamente diferentes de los grupos de no mAb grupo se indican con *, mientras que # indica niveles de METH y AMP significativamente diferentes del grupo de no mAb. Las concentraciones en el cerebro de METH disminuyeron en todo momento excepto 24 h después del tratamiento con mAb6H4. mAb6H4 no tuvo efecto sobre las concentraciones en el cerebro de AMP. mAb4G9 disminuyó significativamente las concentraciones en el cerebro de METH en todos los momentos de tiempo, mientras que las concentraciones en el cerebro de AMP disminuyeron significativamente en los momentos de tiempo 5 y 30 min.
- 45 **[0016]** La **Fig. 10** representa dos gráficas que muestran el efecto de mAb6H4 (Panel A) y mAb4G9 (Panel B) sobre las concentraciones de METH (círculos rellenos) y AMP (círculos blancos) en cerebro de rata. METH se infundió usando una minibomba osmótica subcutánea y, una vez se alcanzaron las concentraciones en estado estacionario, se administró mAb anti-METH. Las ratas se sacrificaron en diversos momentos de tiempo para la determinación de concentraciones de METH y AMP en cerebro. Se usó ANOVA unilaterial, seguido de una prueba de Dunnett, para comparar valores de METH y AMP de control y post-mAb. Los niveles en cerebro de METH significativamente diferentes de los grupos de no mAb grupo se indican con *, mientras que # indica niveles de METH y AMP significativamente diferentes del grupo de no mAb. Las concentraciones en el cerebro de METH disminuyeron en todo momento excepto 24 h después del tratamiento con mAb6H4. mAb6H4 no tuvo efecto sobre las concentraciones en el cerebro de AMP. mAb4G9 disminuyó significativamente las concentraciones en el cerebro de METH en todos los momentos de tiempo, mientras que las concentraciones en el cerebro de AMP disminuyeron significativamente en los momentos de tiempo 5 y 30 min.
- 50 **[0017]** La **Fig. 11** representa dos gráficas que muestran el efecto de mAb6H4 (Panel A) y mAb4G9 (Panel B) sobre las concentraciones de METH (círculos rellenos) y AMP (círculos blancos) en cerebro de rata. METH se infundió usando una minibomba osmótica subcutánea y, una vez se alcanzaron las concentraciones en estado estacionario, se administró mAb anti-METH. Las ratas se sacrificaron en diversos momentos de tiempo para la determinación de concentraciones de METH y AMP en cerebro. Se usó ANOVA unilaterial, seguido de una prueba de Dunnett, para comparar valores de METH y AMP de control y post-mAb. Los niveles en cerebro de METH significativamente diferentes de los grupos de no mAb grupo se indican con *, mientras que # indica niveles de METH y AMP significativamente diferentes del grupo de no mAb. Las concentraciones en el cerebro de METH disminuyeron en todo momento excepto 24 h después del tratamiento con mAb6H4. mAb6H4 no tuvo efecto sobre las concentraciones en el cerebro de AMP. mAb4G9 disminuyó significativamente las concentraciones en el cerebro de METH en todos los momentos de tiempo, mientras que las concentraciones en el cerebro de AMP disminuyeron significativamente en los momentos de tiempo 5 y 30 min.
- 55 **[0018]** La **Fig. 12** representa dos gráficas que muestran el efecto de mAb6H4 (Panel A) y mAb4G9 (Panel B) sobre las concentraciones de METH (círculos rellenos) y AMP (círculos blancos) en cerebro de rata. METH se infundió usando una minibomba osmótica subcutánea y, una vez se alcanzaron las concentraciones en estado estacionario, se administró mAb anti-METH. Las ratas se sacrificaron en diversos momentos de tiempo para la determinación de concentraciones de METH y AMP en cerebro. Se usó ANOVA unilaterial, seguido de una prueba de Dunnett, para comparar valores de METH y AMP de control y post-mAb. Los niveles en cerebro de METH significativamente diferentes de los grupos de no mAb grupo se indican con *, mientras que # indica niveles de METH y AMP significativamente diferentes del grupo de no mAb. Las concentraciones en el cerebro de METH disminuyeron en todo momento excepto 24 h después del tratamiento con mAb6H4. mAb6H4 no tuvo efecto sobre las concentraciones en el cerebro de AMP. mAb4G9 disminuyó significativamente las concentraciones en el cerebro de METH en todos los momentos de tiempo, mientras que las concentraciones en el cerebro de AMP disminuyeron significativamente en los momentos de tiempo 5 y 30 min.
- 60 **[0019]** La **Fig. 13** representa dos gráficas que muestran el efecto de mAb6H4 (Panel A) y mAb4G9 (Panel B) sobre las concentraciones de METH (círculos rellenos) y AMP (círculos blancos) en cerebro de rata. METH se infundió usando una minibomba osmótica subcutánea y, una vez se alcanzaron las concentraciones en estado estacionario, se administró mAb anti-METH. Las ratas se sacrificaron en diversos momentos de tiempo para la determinación de concentraciones de METH y AMP en cerebro. Se usó ANOVA unilaterial, seguido de una prueba de Dunnett, para comparar valores de METH y AMP de control y post-mAb. Los niveles en cerebro de METH significativamente diferentes de los grupos de no mAb grupo se indican con *, mientras que # indica niveles de METH y AMP significativamente diferentes del grupo de no mAb. Las concentraciones en el cerebro de METH disminuyeron en todo momento excepto 24 h después del tratamiento con mAb6H4. mAb6H4 no tuvo efecto sobre las concentraciones en el cerebro de AMP. mAb4G9 disminuyó significativamente las concentraciones en el cerebro de METH en todos los momentos de tiempo, mientras que las concentraciones en el cerebro de AMP disminuyeron significativamente en los momentos de tiempo 5 y 30 min.
- 65 **[0020]** La **Fig. 14** representa dos gráficas que muestran el efecto de mAb6H4 (Panel A) y mAb4G9 (Panel B) sobre las concentraciones de METH (círculos rellenos) y AMP (círculos blancos) en cerebro de rata. METH se infundió usando una minibomba osmótica subcutánea y, una vez se alcanzaron las concentraciones en estado estacionario, se administró mAb anti-METH. Las ratas se sacrificaron en diversos momentos de tiempo para la determinación de concentraciones de METH y AMP en cerebro. Se usó ANOVA unilaterial, seguido de una prueba de Dunnett, para comparar valores de METH y AMP de control y post-mAb. Los niveles en cerebro de METH significativamente diferentes de los grupos de no mAb grupo se indican con *, mientras que # indica niveles de METH y AMP significativamente diferentes del grupo de no mAb. Las concentraciones en el cerebro de METH disminuyeron en todo momento excepto 24 h después del tratamiento con mAb6H4. mAb6H4 no tuvo efecto sobre las concentraciones en el cerebro de AMP. mAb4G9 disminuyó significativamente las concentraciones en el cerebro de METH en todos los momentos de tiempo, mientras que las concentraciones en el cerebro de AMP disminuyeron significativamente en los momentos de tiempo 5 y 30 min.

Resumen de la invención

[0015] Un aspecto de la invención engloba un anticuerpo monoclonal que reconoce cada compuesto del grupo que consiste en (+)anfetamina, (+)metanfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina, obtenible usando un agente inmunizante que comprende la fórmula



[0016] También se desvela un procedimiento de tratamiento del uso de drogas en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1. El anticuerpo monoclonal disminuye la concentración de al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en (+)anfetamina, (+)metanfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina en el cerebro del sujeto.

[0017] Todavía otro aspecto de la invención engloba un ensayo para detectar la presencia de al menos un compuesto en una muestra. El compuesto está seleccionado del grupo de compuestos que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina. El ensayo comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 y detectar la asociación del anticuerpo monoclonal en la muestra con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina.

[0018] Otro aspecto de la invención engloba un kit. El kit comprende un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1.

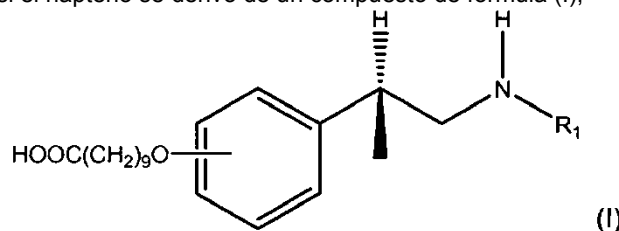
Descripción detallada de la invención

[0019] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que tienen especificidad y afinidad por (+)metanfetamina y compuestos similares a (+)metanfetamina. Estos anticuerpos reconocen (+)anfetamina, (+)metanfetamina y (+)MDMA, y no reconocen sustancialmente (-)anfetamina, (-)metanfetamina y (-)MDMA. Debido a su especificidad y afinidad, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para tratar el uso de drogas en un sujeto.

I. Anticuerpos monoclonales de la invención

[0020] Se desvelan anticuerpos monoclonales que reconocen al menos un compuesto del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, anticuerpos monoclonales que reconocen al menos dos compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, y anticuerpos monoclonales que reconocen los tres compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA. También se desvelan anticuerpos monoclonales que reconocen los tres compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, y no reconocen sustancialmente medicaciones de venta sin receta. También se desvelan anticuerpos monoclonales que reconocen los tres compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, y no reconocen sustancialmente medicaciones de venta con receta similares a no (+)metanfetamina. Cada uno de los anticuerpos monoclonales anteriores no reconoce sustancialmente (-)metanfetamina, (-)anfetamina y (-)MDMA.

[0021] Un anticuerpo de la invención "reconoce" un compuesto si la relación de Cl_{50} para ese anticuerpo es superior a aproximadamente el 20%. La relación de Cl_{50} puede calcularse en referencia a tanto (+)metanfetamina como (+)anfetamina. Normalmente, si el anticuerpo se genera con un hapteno derivado de (+)metanfetamina, entonces la relación de Cl_{50} debe determinarse en referencia a (+)metanfetamina. Similarmente, si el anticuerpo se genera con un hapteno derivado de (+)anfetamina, entonces la relación de Cl_{50} debe determinarse en referencia a (+)anfetamina. Por ejemplo, si el hapteno se derivó de un compuesto de fórmula (I),



en la cual R_1 es hidrógeno (es decir, que forma (+)anfetamina), entonces la relación de Cl_{50} debe determinarse en referencia a (+)anfetamina. Alternativamente, si R_1 de fórmula (I) es un grupo metilo (es decir, que forma

(+)metanfetamina), entonces la relación de CI_{50} debe determinarse en referencia a (+)metanfetamina.

[0022] En referencia a (+)metanfetamina, la relación de CI_{50} se refiere a la relación de CI_{50} para (+)metanfetamina en presencia de (+)metanfetamina marcada con respecto a CI_{50} para un ligando de prueba en presencia de (+)metanfetamina marcada. El valor de CI_{50} es la concentración del ligando de prueba requerido para inhibir el 50% de la unión de (+)metanfetamina marcada. Por ejemplo, véase la Tabla 2 en los ejemplos.

[0023] En referencia a (+)anfetamina, la relación de CI_{50} se refiere a la relación de CI_{50} para (+)anfetamina en presencia de (+)anfetamina marcada con respecto a CI_{50} para un ligando de prueba en presencia de (+)anfetamina marcada. El valor de CI_{50} es la concentración de ligando de prueba requerida para inhibir el 50% de la unión de (+)anfetamina marcada.

[0024] Independientemente de si la relación de CI_{50} se determina en referencia a (+)metanfetamina o (+)anfetamina, un anticuerpo de la invención "reconoce" un compuesto si la relación de CI_{50} es superior a aproximadamente el 20%. En una realización, un anticuerpo monoclonal de la invención tiene una relación de CI_{50} superior a aproximadamente el 20%, superior a aproximadamente el 23%, superior a aproximadamente el 25%, superior a aproximadamente el 27%, superior a aproximadamente el 30%, superior a aproximadamente el 33%, superior a aproximadamente el 35%, superior a aproximadamente el 37%, superior a aproximadamente el 40%, superior a aproximadamente el 43%, superior a aproximadamente el 45%, superior a aproximadamente el 47%, superior a aproximadamente el 50%, superior a aproximadamente el 53%, superior a aproximadamente el 55%, superior a aproximadamente el 57%, superior a aproximadamente el 60%, superior a aproximadamente el 63%, superior a aproximadamente el 65%, superior a aproximadamente el 67%, superior a aproximadamente el 70%, superior a aproximadamente el 73%, superior a aproximadamente el 75%, superior a aproximadamente el 77%, superior a aproximadamente el 80%, superior a aproximadamente el 83%, superior a aproximadamente el 85%, superior a aproximadamente el 87%, superior a aproximadamente el 90%, superior a aproximadamente el 93%, superior a aproximadamente el 95%, superior a aproximadamente el 97%, o superior a aproximadamente el 100% para (+)metanfetamina (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-(+)METH).

[0025] En otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención tiene una relación de CI_{50} superior a aproximadamente el 20%, superior a aproximadamente el 23%, superior a aproximadamente el 25%, superior a aproximadamente el 27%, superior a aproximadamente el 30%, superior a aproximadamente el 33%, superior a aproximadamente el 35%, superior a aproximadamente el 37%, superior a aproximadamente el 40%, superior a aproximadamente el 43%, superior a aproximadamente el 45%, superior a aproximadamente el 47%, superior a aproximadamente el 50%, superior a aproximadamente el 53%, superior a aproximadamente el 55%, superior a aproximadamente el 57%, superior a aproximadamente el 60%, superior a aproximadamente el 63%, superior a aproximadamente el 65%, superior a aproximadamente el 67%, superior a aproximadamente el 70%, superior a aproximadamente el 73%, superior a aproximadamente el 75%, superior a aproximadamente el 77%, superior a aproximadamente el 80%, superior a aproximadamente el 83%, superior a aproximadamente el 85%, superior a aproximadamente el 87%, superior a aproximadamente el 90%, superior a aproximadamente el 93%, superior a aproximadamente el 95%, superior a aproximadamente el 97%, o superior a aproximadamente el 100% para (+)anfetamina (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-(+)AMP).

[0026] En otra realización más, un anticuerpo monoclonal de la invención tiene una relación de CI_{50} superior a aproximadamente el 20%, superior a aproximadamente el 23%, superior a aproximadamente el 25%, superior a aproximadamente el 27%, superior a aproximadamente el 30%, superior a aproximadamente el 33%, superior a aproximadamente el 35%, superior a aproximadamente el 37%, superior a aproximadamente el 40%, superior a aproximadamente el 43%, superior a aproximadamente el 45%, superior a aproximadamente el 47%, superior a aproximadamente el 50%, superior a aproximadamente el 53%, superior a aproximadamente el 55%, superior a aproximadamente el 57%, superior a aproximadamente el 60%, superior a aproximadamente el 63%, superior a aproximadamente el 65%, superior a aproximadamente el 67%, superior a aproximadamente el 70%, superior a aproximadamente el 73%, superior a aproximadamente el 75%, superior a aproximadamente el 77%, superior a aproximadamente el 80%, superior a aproximadamente el 83%, superior a aproximadamente el 85%, superior a aproximadamente el 87%, superior a aproximadamente el 90%, superior a aproximadamente el 93%, superior a aproximadamente el 95%, superior a aproximadamente el 97%, o superior a aproximadamente el 100% para (+)MDMA (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-(+)MDMA).

[0027] En todavía otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención tiene una relación de CI_{50} superior a aproximadamente el 20%, superior a aproximadamente el 23%, superior a aproximadamente el 25%, superior a aproximadamente el 27%, superior a aproximadamente el 30%, superior a aproximadamente el 33%, superior a aproximadamente el 35%, superior a aproximadamente el 37%, superior a aproximadamente el 40%, superior a aproximadamente el 43%, superior a aproximadamente el 45%, superior a aproximadamente el 47%, superior a aproximadamente el 50%, superior a aproximadamente el 53%, superior a aproximadamente el 55%, superior a aproximadamente el 57%, superior a aproximadamente el 60%, superior a aproximadamente el 63%, superior a aproximadamente el 65%, superior a aproximadamente el 67%, superior a aproximadamente el 70%, superior a aproximadamente el 73%, superior a aproximadamente el 75%, superior a aproximadamente el 77%, superior a

aproximadamente el 7%, inferior a aproximadamente el 6%, inferior a aproximadamente el 5%, inferior a aproximadamente el 4%, inferior a aproximadamente el 3%, inferior a aproximadamente el 2%, o inferior a aproximadamente el 1% para medicaciones de venta con receta similares a no (+)metanfetamina.

5 **[0032]** Una realización a modo de ejemplo de un anticuerpo monoclonal que reconoce cada compuesto del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, pero no reconoce sustancialmente (-)metanfetamina, (-)anfetamina y (-)MDMA, es un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID N°: 25 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID N°: 26 [es decir, el anticuerpo monoclonal denominado en la presente memoria mAb4G9]. Otra realización a modo de ejemplo de un anticuerpo que reconoce cada compuesto del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, pero no reconoce sustancialmente (-)metanfetamina, (-)anfetamina y (-)MDMA, es un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID N°: 19 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID N°: 21 [es decir, el anticuerpo monoclonal denominado en la presente memoria mAb2F11].

15 **[0033]** Los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de anticuerpos monoclonales sin apartarse del alcance de la invención. En una realización, la invención engloba anticuerpos monoclonales murinos. Ejemplos no limitantes de anticuerpos monoclonales murinos incluyen anticuerpos monoclonales de ratón y de rata. En otra realización, la invención engloba anticuerpos monoclonales humanos. En otra realización más, la invención engloba anticuerpos monoclonales humanizados. En todavía otra realización, la invención engloba anticuerpos monoclonales quiméricos. En una realización alternativa, la invención engloba anticuerpos monoclonales recombinantes. Los anticuerpos monoclonales recombinantes incluyen anticuerpos que han sido manipulados de forma que reduzcan la inmunogenicidad de los anticuerpos cuando se usan como medicación. En otra alternativa, la invención engloba fragmentos de anticuerpos monoclonales. Ejemplos no limitantes de tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos de unión a antígeno monocatenarios (scFv), fragmentos Fv estabilizados con disulfuro (dsFv), fragmentos de unión a antígeno de un único dominio, y otros fragmentos de anticuerpos que mantienen la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal completo, pero que son menos
25
30 inmunogénicos, más rentables de producir, o más farmacéuticamente eficaces que el anticuerpo monoclonal completo.

[0034] Los anticuerpos monoclonales pueden tener cadena ligera lambda, kappa, o una recombinante. Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales son normalmente, pero no necesariamente, anticuerpos IgG. En ciertas realizaciones, los anticuerpos IgG pueden incluir anticuerpos de las clases de anticuerpos humanos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otras realizaciones, los anticuerpos IgG pueden incluir anticuerpos de las clases de anticuerpos de ratón IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3.

II. Procedimientos de preparación de anticuerpos monoclonales

40

a. Compuestos de hapteno para preparar anticuerpos monoclonales

[0035] Los compuestos de hapteno pueden usarse para provocar anticuerpos monoclonales que reconocen al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, pero no reconocen sustancialmente (-)metanfetamina, (-)anfetamina y (-)MDMA. En ciertas realizaciones, el compuesto de hapteno se diseña para generar anticuerpos monoclonales que reconocen al menos dos compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA. En una realización a modo de ejemplo, el compuesto de hapteno se diseña para generar anticuerpos monoclonales que reconocen los tres compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA. Normalmente, un compuesto de hapteno tal comprenderá tanto (+)metanfetamina como (+)anfetamina conjugada con un ligador (L).

[0036] En general, L comprende átomos y es de una longitud suficiente de manera que L es suficientemente flexible para facilitar una orientación de la (+)metanfetamina o (+)anfetamina suficiente para generar anticuerpos deseados. En este contexto, anticuerpos "deseados" incluyen anticuerpos que reconocen al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA. L también es normalmente no fuertemente inmunogénico. En otras palabras, L puede diseñarse de manera que anticuerpos generados contra un compuesto de la invención reconozcan el compuesto sin la necesidad de que L se ligue al compuesto o esté presente en un sujeto durante el tratamiento.

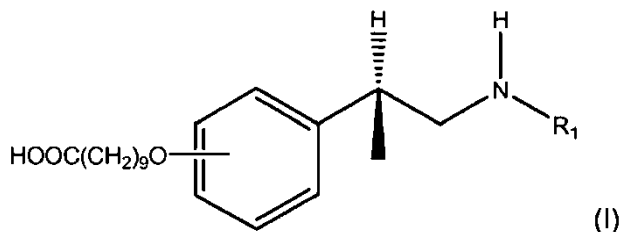
[0037] La longitud exacta de L puede variar y variará. Normalmente, L tiene al menos 9 angstroms de longitud. En una realización, L puede tener aproximadamente 9 angstroms a aproximadamente 27 o más angstroms de longitud. En otra realización, L tiene al menos 11 angstroms, al menos 12 angstroms, al menos 13 angstroms, al menos 14 angstroms, al menos 15 angstroms, al menos 16 angstroms, al menos 17 angstroms, al menos 18 angstroms, al menos 19 angstroms, al menos 20 angstroms, al menos 21 angstroms, al menos 22 angstroms, al menos 23 angstroms, al menos 24 angstroms, al menos 25 angstroms, al menos 26 angstroms, o al menos 27 angstroms. La

longitud del ligador cuando se expresa en angstroms puede determinarse realizando un estudio de modelado usando, por ejemplo, el campo de fuerza MM94. Establecido de otra forma, la longitud de L puede expresarse como el número de átomos contiguos que forman la trayectoria más corta de una subestructura que conecta L con la otra subestructura. En una realización, L tiene al menos 6 átomos contiguos de longitud. En otra realización, L puede tener de aproximadamente 8 a aproximadamente 100 o más átomos de longitud. En una realización adicional, L tiene 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 o más átomos contiguos de longitud.

[0038] Como será apreciado por un experto, los átomos que comprenden L pueden variar ampliamente. Normalmente, los átomos confieren el grado de flexibilidad apropiado, como se ha detallado anteriormente. Átomos adecuados que forman L pueden seleccionarse del grupo que comprende hidrocarbilo, hidrocarbilos sustituidos y heteroátomos. En algunas realizaciones, L puede comprender aminoácidos tales como glicina o prolina. Por ejemplo, L puede ser un péptido. En otras realizaciones, L puede comprender nucleótidos. En otras realizaciones, L puede ser lineal, ramificado, o puede comprender estructuras de anillo.

[0039] También se prevé que L pueda unirse al anillo de benceno de (+)metanfetamina o (+)anfetamina en una variedad de posiciones sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, en una realización, L puede unirse en la posición meta del anillo de benceno. En otra realización, L puede unirse en la posición orto. En otra realización más, L puede unirse en la posición para.

[0040] En una realización a modo de ejemplo, el compuesto de hapteno puede comprender un compuesto de fórmula (I):



en la cual:

R_1 está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno y metilo. En algunas realizaciones, R_1 es hidrógeno (es decir, que forma (+)anfetamina). En otras realizaciones, R_1 es un grupo metilo (es decir, que forma (+)metanfetamina). En la fórmula (I), L se representa por el grupo $-O(CH_2)_9COOH$. Por tanto, en una realización, el grupo $-O(CH_2)_9COOH$ puede estar en la posición orto. En otra realización, el grupo $-O(CH_2)_9COOH$ puede estar en la posición meta. En otra realización más, el grupo $-O(CH_2)_9COOH$ puede estar en la posición para. En otras realizaciones a modo de ejemplo, el compuesto de hapteno puede comprender un compuesto enumerado en la Tabla 1 o Ejemplo 1 en la presente memoria.

b. Agentes inmunizantes que comprenden compuestos de hapteno

[0041] Para provocar una respuesta de anticuerpos pueden usarse agentes inmunizantes que comprenden compuestos de hapteno. En ciertas realizaciones, un agente inmunizante puede comprender un compuesto de hapteno y un adyuvante. En términos generales, un adyuvante puede usarse para aumentar la respuesta inmunitaria a un compuesto de hapteno. Por ejemplo, un adyuvante puede usarse para aumentar la afinidad del anticuerpo, título de anticuerpos y la duración de la respuesta inmunitaria. Ejemplos no limitantes de adyuvantes incluyen alumbre, TiterMax Gold, Ribí, ASO_4 , adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund. En una realización, el adyuvante puede ser alumbre. En otra realización, el adyuvante puede ser TiterMax Gold. En otra realización más, el adyuvante puede ser Ribí. En todavía otra realización, el adyuvante puede ser ASO_4 . En todavía otra realización, el adyuvante puede ser adyuvante completo de Freund. En una realización adicional, el adyuvante puede ser adyuvante incompleto de Freund.

[0042] En algunas realizaciones, un agente inmunizante puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Brevemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable provoca con seguridad una respuesta de anticuerpos en un sujeto. En este contexto, con seguridad significa que el vehículo no provoca sustancialmente una respuesta inmunitaria que reacciona de forma cruzada con una auto-proteína, o una proteína regularmente ingerida. Normalmente, el vehículo puede ser una proteína, lípido, hidrato de carbono o cualquier combinación de los mismos que pueda provocar una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el vehículo es una proteína. En una realización particular, el vehículo puede seleccionarse del grupo de proteínas que comprende hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de huevo, albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de oveja, tiroglobulina, y cualquier modificación, derivado o análogo de los mismos. Por ejemplo, en una realización, el vehículo puede ser BSA o BSA cationizada. En otra realización, el vehículo puede ser KLH. En otra realización más, el vehículo puede ser tiroglobulina.

[0043] En otra realización particular, el vehículo puede ser una toxina o toxoide bacteriano. Ejemplos no limitantes de toxinas o toxoides bacterianos adecuados pueden incluir toxoide tetánico, toxoide diftérico, toxoide diftérico mutante no tóxico CRM₁₉₇, complejo de proteína de la membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis*, la subunidad B de *Escherichia coli* lábil al calor, exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), toxina B del cólera (CTB), toxina de pertussis y hemaglutinina filamentosa, toxina Shiga, y la familia LTB de toxinas bacterianas.

[0044] En una realización alternativa, un agente inmunizante que comprende un compuesto de hapteno puede comprender además un excipiente. Ejemplos no limitantes de excipientes incluyen agua estéril, disoluciones salinas tales como solución salina, fosfato de sodio, cloruro sódico, alcohol, goma arábica, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicol, gelatina, manitol, hidratos de carbono, estearato de magnesio, parafina viscosa, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y tampón. Otros excipientes adecuados pueden ser usados por aquellos expertos en la materia.

c. Procedimientos de hibridoma

[0045] Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando procedimientos de hibridoma, tales como aquellos descrito por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado es normalmente inmunizado con un agente inmunizante, como se ha descrito anteriormente, para provocar linfocitos para que produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

[0046] El agente inmunizante comprenderá normalmente un compuesto de hapteno que puede provocar anticuerpos que reconocen al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, pero no reconocen sustancialmente (-)metanfetamina, (-)anfetamina y (-)MDMA, como se ha descrito anteriormente y como se ha detallado en los ejemplos.

[0047] Generalmente, los linfocitos del animal huésped inmunizado con un compuesto de hapteno se recogen y se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pág. 59-103]. Pueden usarse linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o pueden usarse células de bazo o células de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Las líneas celulares inmortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente se emplean líneas de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas sin fusionar. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[0048] Líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la expresión estable de alto nivel del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Centro de distribución de células del Instituto Salk, San Diego, Calif. y la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Va. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pág. 51-63].

[0049] El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan puede entonces ensayarse para la presencia de anticuerpos monoclonales que reconocen al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA, pero no reconocen sustancialmente (-)metanfetamina, (-)anfetamina y (-)MDMA. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). En una realización a modo de ejemplo, la especificidad de unión se determina usando el procedimiento RIA detallado en los ejemplos.

[0050] Después de identificarse las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos convencionales [Goding, arriba]. Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

[0051] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido ascítico por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tal como, por ejemplo,

cromatografía de proteína A-Sepharose, proteína G-Sepharose, hidroxapatita, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

d. Procedimientos de anticuerpos recombinantes

5

[0052] Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como aquellos descritos en la patente US 4.816.567. El ADN (que incluye ADNc derivado de la transcripción inversa de ARN) que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede disponerse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas [patente US 4.816.567] o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para una polipéptido de no inmunoglobulina. Un polipéptido de no inmunoglobulina tal puede estar sustituido con los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede estar sustituido con los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico. Procedimientos de creación de anticuerpos recombinantes o quiméricos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

[0053] Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos de preparación de anticuerpos monovalentes son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera de la inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. La cadena pesada está generalmente truncada en cualquier punto en la región Fc de forma que se prevenga la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes están sustituidos con otro residuo de aminoácido o son deletados de forma que se prevenga la reticulación.

30

[0054] Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede llevarse a cabo usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

[0055] Los anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos también pueden producirse en sistemas de expresión de planta. Para más detalles véase Peterson y col., *The AAPS Journal* 2006; 8(2): E383.

e. Procedimientos de anticuerpos humanos y humanizados

[0056] Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tal como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos con residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, correspondiéndose todas o sustancialmente todas las regiones CDR con aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

[0057] Procedimientos de humanización de anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos no humanos de aminoácidos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1968); Verhoeven y col., *Science*, 239:1534-1536 (1998)) sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedor con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente US 4.816.567) en los cuales

65

sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

5

[0058] Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de expresión en fago [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)). Similarmente, anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcialmente o completamente inactivados. Tras la exposición se observa la producción de anticuerpo humano, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, que incluyen transposición de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995).

[0059] Los anticuerpos también pueden madurarse por afinidad usando procedimientos de selección y/o mutagénesis conocidos como se ha descrito anteriormente. Anticuerpos madurados por afinidad preferidos tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, incluso más preferentemente 20 ó 30 veces, superior a la del anticuerpo de partida (generalmente murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo madurado.

25

III. Procedimientos de uso de los anticuerpos monoclonales

[0060] Otro aspecto de la invención engloba usos tanto terapéuticos como no terapéuticos para los anticuerpos monoclonales generados usando los procedimientos de la Sección II anterior.

30

a. Usos no terapéuticos

[0061] En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales pueden usarse en ensayos no terapéuticos tales como inmunotinción, inmunoprecipitación, inmunotransferencia, purificación por inmutofinidad, ensayos inmunocromatográficos, ensayos de flujo lateral y ELISA. En una realización, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para inmunotinción. En otra realización, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para inmunoprecipitación. En otra realización más, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para inmunotransferencia. En todavía otra realización, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para purificación por inmutofinidad. En todavía otra realización, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para ELISA. En una realización alternativa, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para ensayos inmunocromatográficos. En otra realización alternativa, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para ensayos de flujo lateral. Protocolos para cada uno de los usos no terapéuticos anteriores son muy conocidos en la técnica, y pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow y Lane, Antibodies, Cold Spring Harbor, 1988, Capítulos 9-14, patente US: 5.160.701, patente US: 5.141.850, patente US: 5.451.504, patente US: 5.415.994 y patente US: 5.559.041, incorporadas por este documento por referencia.

[0062] Adicionalmente, uno o más anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse para detectar (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA en una muestra usando un ensayo no terapéutico descrito anteriormente. Por ejemplo, una realización de la invención es un ensayo para detectar la presencia de al menos un compuesto en una muestra seleccionada del grupo de compuestos que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina. El ensayo comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal de la invención y detectar la asociación del anticuerpo monoclonal en la muestra con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina. En algunas realizaciones, el ensayo puede comprender además cuantificar la cantidad de un compuesto en la muestra seleccionada del grupo de compuestos que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina.

[0063] Un anticuerpo monoclonal puede usarse para detectar y/o cuantificar al menos un compuesto del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA en una muestra. En otra realización, un anticuerpo monoclonal puede usarse para detectar y/o cuantificar al menos dos compuestos del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA en una muestra. En otra realización más, un anticuerpo monoclonal puede usarse para detectar y/o cuantificar cada compuesto del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA en una muestra. En una realización alternativa, más de un anticuerpo monoclonal puede usarse para detectar y/o cuantificar cada compuesto del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA en una muestra. Procedimientos y dispositivos para usar anticuerpos para detectar y/o cuantificar

65

sustancias en muestras son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase la patente US 5.328.828.

[0064] Como se usa en la presente memoria, "muestra" puede referirse a una muestra biológica de un sujeto o una muestra de una sustancia química. Ejemplos no limitantes de muestras biológicas de un sujeto pueden incluir muestras de fluido o muestras de tejido. Las muestras de fluido pueden incluir sangre (incluyendo suero o plasma), orina, saliva u otros fluidos biológicos que podrían comprender (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA. Las muestras de tejido pueden incluir muestras de pelo o piel, u otros tejidos biológicos que podrían comprender (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA. Los procedimientos de recogida de muestras biológicas son muy conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de sustancias químicas pueden incluir polvos, píldoras y líquidos. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de la invención puede usarse para detectar (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA en un polvo de composición desconocida.

b. Usos terapéuticos

[0065] Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para fines terapéuticos. En términos generales, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para antagonizar los efectos de (+)metanfetamina, (+)anfetamina y/o (+)MDMA en un sujeto. En ciertas realizaciones, los sujetos pueden estar usando (+)metanfetamina, (+)anfetamina y/o (+)MDMA. Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos monoclonales pueden antagonizar los efectos de (+)metanfetamina, (+)anfetamina y/o (+)MDMA en un sujeto disminuyendo la concentración de (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA en el cerebro de un sujeto. En otra realización, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para reducir el comportamiento de búsqueda de drogas en un sujeto. En otra realización más, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para reducir el comportamiento de autodosificación en un sujeto. Procedimientos para cada una de las realizaciones anteriores pueden encontrarse en los ejemplos.

[0066] En cada uno de las realizaciones anteriores, los anticuerpos monoclonales pueden administrarse pasivamente. Administración pasiva normalmente se refiere a administrar al menos un anticuerpo monoclonal, generado por un sujeto, a un segundo sujeto, o alternativamente, administrar al menos un anticuerpo monoclonal producido por procedimientos *ex vivo* a un sujeto.

[0067] En una realización, la invención puede englobar un procedimiento de tratamiento del uso de drogas. El procedimiento puede comprender administrar un anticuerpo monoclonal a un sujeto, en el cual la administración pasiva disminuye la concentración de (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA en el cerebro del sujeto. En otra realización, el procedimiento puede comprender administrar un anticuerpo monoclonal a un sujeto, en el cual el anticuerpo monoclonal disminuye la concentración de dos o más del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA en el cerebro del sujeto. En otra realización más, el procedimiento puede comprender administrar un anticuerpo monoclonal a un sujeto, en el cual el anticuerpo monoclonal disminuye la concentración de (+)anfetamina, (+)metanfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina en el cerebro del sujeto.

[0068] Alternativamente, el procedimiento de tratamiento del uso de drogas puede comprender administrar más de un anticuerpo monoclonal a un sujeto para reducir la concentración de (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA en el cerebro del sujeto. Si se administra más de un anticuerpo a un sujeto, los anticuerpos pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente. En una realización, cada anticuerpo monoclonal administrado a un sujeto tiene un perfil farmacocinético diferente. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que tiene una semivida corta puede administrarse junto con un anticuerpo monoclonal que tiene una semivida prolongada. En otra realización, cada anticuerpo monoclonal administrado a un sujeto tiene una afinidad diferente por un compuesto diana particular. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que reconoce (+)metanfetamina puede administrarse junto con un anticuerpo monoclonal que reconoce (+)anfetamina. Alternativamente, un anticuerpo monoclonal que reconoce al menos un compuesto seleccionado del grupo que comprende (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)MDMA puede administrarse con un anticuerpo monoclonal que reconoce otra droga, tal como cocaína, fenciclidina, opioides o nicotina.

c. Composiciones farmacéuticas

[0069] Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas y administrarse por varios medios diferentes que administrarán una dosis terapéuticamente eficaz. Tales composiciones pueden administrarse por vía oral, parenteralmente, por espray para inhalación, rectalmente, intradérmicamente o transdérmicamente, en formulaciones unitarias de dosificación que contienen excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, según se desee. El término parenteral como se usa en la presente memoria incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraesternal, o técnicas de infusión. La formulación de composiciones farmacéuticas se trata en, por ejemplo, Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1975) y Liberman, H. A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y. (1980).

[0070] Preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión

adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, aceites no volátiles estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico son útiles en la preparación de inyectables. Pueden usarse dimetilacetamida, tensioactivos que incluyen detergentes iónicos y no iónicos, y polietilenglicoles. También son útiles mezclas de disolventes y agentes humectantes tales como aquellos tratados anteriormente.

- 10 **[0071]** Para fines terapéuticos, las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de disoluciones o suspensiones para inyección estéril isotónica acuosa o no acuosa. Estas disoluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos estériles o gránulos que tienen uno o más de los vehículos o diluyentes mencionados para su uso en las formulaciones para administración por vía oral. Los compuestos pueden disolverse en agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, 15 aceite de sésamo, alcohol bencílico, cloruro sódico y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son muy y ampliamente conocidos en la ciencia farmacéutica.

- [0072]** Formas de dosificación líquidas para administración por vía oral pueden incluir emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes comúnmente 20 usados en la materia, tales como agua. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, y edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

- [0073]** La cantidad del compuesto de la invención que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una única dosificación de la composición variará dependiendo del paciente y el modo particular de 25 administración. Aquellos expertos en la materia apreciarán que también pueden determinarse dosificaciones con orientación de Goodman & Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, novena edición (1996), Apéndice II, pág. 1707-1711 y de Goodman & Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, décima edición (2001), Apéndice II, pág. 475-493. En términos generales, la dosificación de anticuerpo monoclonal puede ser aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del sujeto por mes a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal del 30 sujeto por mes. En una realización, la dosificación de anticuerpo monoclonal puede ser de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del sujeto por mes a aproximadamente 125 mg/kg de peso corporal del sujeto por mes. En otra realización, la dosificación de anticuerpo monoclonal puede ser de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto por mes a aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal del sujeto por mes. En otra realización más, la dosificación de anticuerpo monoclonal puede ser de aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del sujeto por mes 35 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto por mes. En una realización preferida, la dosificación de anticuerpo monoclonal puede ser de aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del sujeto por mes a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal del sujeto por mes.

d. Kits

- 40 **[0074]** Otro aspecto de la invención engloba kits. Los kits normalmente comprenden un anticuerpo de la invención descrito anteriormente. Los kits pueden comprender además instrucciones para detectar y/o cuantificar la presencia de al menos un compuesto en una muestra seleccionada del grupo de compuestos que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina usando los procedimientos descritos 45 anteriormente y en los ejemplos. Los kits también pueden comprender medios para recoger una muestra. En algunas realizaciones, la muestra puede ser biológica. En otras realizaciones, la muestra puede ser química. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los kits pueden usarse para detectar y/o cuantificar la presencia de al menos un compuesto en una muestra de pelo o de sangre seleccionada del grupo de compuestos que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina.

Definiciones

- [0075]** Como se usa en la presente memoria “(d)” representa dextrógiro y “(ℓ)” representa levógiro, y se refiere a la dirección en la que un enantiómero gira el plano de la luz polarizada. En la presente memoria, (d) se usa 55 indistintamente con (+) y (ℓ) se usa indistintamente con (-).

- [0076]** A menos que se indique lo contrario, los grupos alquilo descritos en la presente memoria son preferentemente alquilo inferior que contiene de uno a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 30 átomos de carbono o más. Pueden ser de cadena lineal o ramificada o cíclicos e incluyen metilo, etilo, propilo, 60 isopropilo, butilo, hexilo y similares. A menos que se indique lo contrario, los grupos alquenilo descritos en la presente memoria son preferentemente alquenilo inferior que contienen de dos a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 30 átomos de carbono o más. Pueden ser de cadena lineal o ramificada o cíclicos e incluyen etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, hexenilo y similares.

- 65 **[0077]** A menos que se indique lo contrario, los grupos alquínilo descritos en la presente memoria son

preferentemente alquinilo inferior que contiene de dos a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 30 átomos de carbono o más. Pueden ser de cadena lineal o ramificada e incluyen etinilo, propinilo, butinilo, isobutinilo, hexinilo y similares.

5 **[0078]** Los términos “arilo” o “ar” como se usan en la presente memoria solos o como parte de otro grupo denotan grupos aromáticos homocíclicos opcionalmente sustituidos, preferentemente grupos monocíclicos o bicíclicos que contienen de 6 a 12 carbonos en la porción de anillo, tal como fenilo, bifenilo, naftilo, fenilo sustituido, bifenilo sustituido o naftilo sustituido. Fenilo y fenilo sustituido son el arilo más preferido.

10 **[0079]** La frase “disminuir la concentración de (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA en el cerebro” puede referirse a tanto disminuir la cantidad de (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA en el cerebro como a cambiar la tasa de entrada de (+)metanfetamina, (+)anfetamina o (+)MDMA en el cerebro.

15 **[0080]** El término “hapteno” se refiere a un antígeno parcial o incompleto. Los haptenos son sustancias libres de proteína que generalmente no pueden estimular la formación de anticuerpos, pero pueden reaccionar con anticuerpos. La anfetamina, la metanfetamina y sus derivados son haptenos.

20 **[0081]** Los términos “heterociclo” o “heterocíclico” como se usan en la presente memoria solos o como parte de otro grupo denotan grupos opcionalmente sustituidos, completamente saturados o insaturados, monocíclicos o bicíclicos, aromáticos o no aromáticos que tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo, y preferentemente 5 ó 6 átomos en cada anillo.

25 **[0082]** El grupo heterociclo tiene preferentemente 1 ó 2 átomos de oxígeno, 1 ó 2 átomos de azufre y/o 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo, y puede unirse al resto de la molécula mediante un carbono o heteroátomo. Grupos heterociclo a modo de ejemplo incluyen heteroaromáticos tales como furilo, tienilo, piridilo, oxazolilo, pirrolilo, indolilo, quinolinilo o isoquinolinilo y similares. Sustituyentes a modo de ejemplo incluyen uno o más de los siguientes grupos: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, ceto, hidroxilo, hidroxilo protegido, acilo, aciloxi, alcoxi, alquenoxi, alquinoxio, ariloxi, halógeno, amido, amino, nitro, ciano, tiol, cetales, acetales, ésteres y éteres.

30 **[0083]** El término “heteroaromático” como se usa en la presente memoria solo o como parte de otro grupo denota grupos aromáticos opcionalmente sustituidos que tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo, y preferentemente 5 ó 6 átomos en cada anillo. El grupo heteroaromático tiene preferentemente 1 ó 2 átomos de oxígeno, 1 ó 2 átomos de azufre y/o 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo, y puede unirse al resto de la molécula mediante un carbono o heteroátomo. Heteroaromáticos a modo de ejemplo incluyen furilo, tienilo, piridilo, oxazolilo, pirrolilo, indolilo, quinolinilo o isoquinolinilo y similares. Sustituyentes a modo de ejemplo incluyen uno o más de los siguientes grupos: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, ceto, hidroxilo, hidroxilo protegido, acilo, aciloxi, alcoxi, alquenoxi, alquinoxio, ariloxi, halógeno, amido, amino, nitro, ciano, tiol, cetales, acetales, ésteres y éteres.

40 **[0084]** Los términos “hidrocarburo” e “hidrocarbilo” como se usan en la presente memoria describen compuestos orgánicos o radicales que consisten exclusivamente en los elementos carbono e hidrógeno. Estos restos incluyen restos alquilo, alquenilo, alquinilo y arilo. Estos restos también incluyen restos alquilo, alquenilo, alquinilo y arilo sustituidos con otros grupos de hidrocarburo alifático o cíclico, tales como alcarilo, alquenarilo y alquinarilo.

45 **[0085]** El término “sujeto” como se usa en la presente memoria se refiere a un mamífero. Mamíferos adecuados pueden incluir ratones, ratas, perros, primates no humanos y seres humanos.

50 **[0086]** Los restos “hidrocarbilo sustituidos” descritos en la presente memoria son restos hidrocarbilo que están sustituidos con al menos un átomo distinto de carbono, que incluyen restos en los que un átomo de la cadena de carbono está sustituido con un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno, silicio, fósforo, boro, azufre, o un átomo de halógeno. Estos sustituyentes pueden incluir uno o más de los siguientes grupos: halógeno, carbociclo, carboxi, arilo, heterociclo, alcoxi, alquenoxi, alquinoxio, ariloxi, hidroxilo, hidroxilo protegido, ceto, acilo, aciloxi, nitro, amino, amido, nitro, ciano, tiol, cetales, acetales, ésteres y éteres.

55 **[0087]** Como podrían hacerse diversos cambios en los compuestos, productos y procedimientos anteriores sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y en los ejemplos facilitados a continuación sea interpretada como ilustrativa y no en un sentido limitante.

Ejemplos

60 **[0088]** Los siguientes ejemplos ilustran diversas iteraciones de la invención.

Ejemplo 1. Diseño de haptenos y selección de anticuerpos.

65 **[0089]** Cuando se generan anticuerpos monoclonales (mAb, plural y singular) contra moléculas pequeñas, la composición química y orientación molecular del hapteno similar a droga sobre el antígeno es un determinante

crucial. Esto es especialmente importante cuando se intenta descubrir mAb terapéutico contra las drogas (+)metanfetamina ((+)METH), (+)anfetamina ((+)AMP) y el compuesto relacionado (+)3,4-metilendioximetanfetamina ((+)MDMA, el isómero positivo en la mezcla racémica conocido como MDMA o éxtasis). El objetivo de estos estudios era diseñar y sintetizar haptenos similares a (+)METH con atributos estructurales que los harían eficaces para
5 generar anticuerpos monoclonales para tratar problemas médicos asociados a estas drogas estimulantes de abuso.

[0090] Para estos estudios, los espaciadores de haptenos entre (+)METH y la proteína portadora se alargaron progresivamente de 4 a 10 átomos para aumentar las posibilidades de mayor interacción del hapteno con el sitio de unión a anticuerpo y/o para aumentar la flexibilidad del espaciador entre la estructura del esqueleto de (+)METH y el
10 vehículo. Se supuso que un alargamiento progresivo y la flexibilidad del brazo espaciador conduciría a aumentar la afinidad y especificidad debido al aumento del acceso a la estructura similar a (+)METH entera. Como estrategia secundaria, la localización de la unión del ligador a la estructura de (+)METH (por ejemplo, uniones en para y meta) se varió en un intento por provocar anticuerpos con diferente selectividad conformacional por compuestos similares a (+)METH.

[0091] Productos químicos y drogas. Todos los productos químicos y antígenos de proteína se compraron de Sigma (St. Louis, MO), a menos que se indique lo contrario. Las enzimas y cepas de *E. coli* se compraron de Invitrogen (Carlsbad, CA). (+)-[2',6'-³H(n)]-metanfetamina ([³H]-(+METH; 23,5 Ci/mmol) y (±)-[2,6-³H(n)]-anfetamina ([³H]-(+AMP; 45 Ci/mmol) se obtuvieron del Instituto nacional de drogadicción (Bethesda, MD) después de la
20 síntesis en el Instituto Triángulo de investigación (Research Triangle Park, NC). Otras drogas similares a METH usadas en este estudio también se obtuvieron del Instituto nacional de drogadicción.

[0092] [³H]-(+METH se usó como se envió, pero [³H]-(+AMP se separó cromatográficamente para obtener [³H]-(+AMP para su uso en los estudios de los inventores de especificidad por (+)AMP. La separación se realizó sobre
25 una columna 150 x 4 mm (d. i.) 5 µm CrownPak CR(+) (Chiral Technologies Inc., Exton, PA). La fase móvil consistió en ácido perclórico 0,1 M (Fisher Scientific) que contenía 10% (v/v) de metanol. La temperatura de la columna se mantuvo a 15°C. La velocidad de flujo fue 1,0 ml/min y el volumen de inyección fue 50 µl. Los picos cromatográficos se detectaron usando detección por absorción ultravioleta a una longitud de onda de 210 nm. Los tiempos de retención para [³H]-(+AMP y [³H]-(-AMP fueron 20,1 min y 24,4 min, respectivamente.

[0093] Haptenos y conjugación de hapteno-proteína. Se sintetizaron cinco haptenos similares a (+)METH de isómero (+) estereoespecíficos diferentes. Todos los haptenos se sintetizaron como sales de HCl para ayudar en la solubilidad, y se guardaron como sólidos o polvos hasta que se usaron. Las estructuras químicas se muestran en la
Tabla 1. La síntesis completa de uno de los haptenos ((+)METH P6) se informó previamente (Byrnes-Blake y col.,
35 2001, Int Immunopharmacol 1:329-338). Los nombres químicos y abreviaturas de los cinco haptenos son:

(S)-(+)-4-(3-carboxipropil)metanfetamina, (+)METH P4
(S)-(+)-4-(5-carboxipentil)metanfetamina, (+)METH P6
(S)-(+)-4-(5-carboxipentiloxi)metanfetamina, (+)METH P06
40 (S)-(+)-3-(5-carboxipentiloxi)metanfetamina, (+)METH MO6
(S)-(+)-3-(9-carboxinoniloxi)metanfetamina, (+)METH MO10

[0094] Cada hapteno se unió inicialmente covalentemente con al menos 2-3 antígenos de proteína diferentes y se usaron para la inmunización de ratones para probar la respuesta de IgG anti-METH. El ratón individual y la
45 combinación de hapteno-antígeno de proteína que dio los mayores títulos de IgG anti-(+)METH se eligió para la producción de anticuerpos monoclonales (véanse los detalles más adelante). Lo siguiente es una lista de los conjugados de hapteno-proteína que produjeron el mAb enumerado en la Tabla 1: (+)METH P4 y (+)METH P6 conjugadas con albúmina de suero bovino; (+)METH P06 y (+)METH MO6 conjugadas con Imject Supercarrier Immune Modulator (BSA cationizada (cBSA), Pierce Biotech, Rockford, IL); (+)METH MO10 conjugada con albúmina
50 de huevo (OVA).

[0095] Todas las reacciones químicas para la unión covalente de los haptenos con antígenos de proteína siguieron el mismo procedimiento general. Los haptenos se solubilizaron primero en tanto tampón ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 0,1 M (pH 4,5) como dimetilformamida y luego se ajustaron a pH 4,5 con HCl. Todos los
55 haptenos se acoplaron a sus antígenos de proteína respectivos por una reacción de carbodiimida usando el ligador cruzado clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (Pierce Biotech). Esta síntesis química forma un enlace peptídico entre el grupo carboxilo del brazo ligador del hapteno y grupos amino libres de las cadenas laterales de las lisina en las proteínas respectivas. Las reacciones se realizaron con agitación continua bajo condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 18 h. Al final de la reacción, todos los antígenos se
60 purificaron como se describe por Byrnes-Blake y col. (2003, Eur J Pharmacol 461:119-128). Esta purificación implicó diálisis contra agua destilada, solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) y una purificación final de la fracción soluble sobre una columna de filtración en gel en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Los antígenos purificados se almacenaron a -20°C hasta que se necesitaron.

[0096] Inmunización, cribado y generación de hibridomas. Ratones BALB/c hembra (Charles River Laboratories,

Wilmington, MA) se usaron para todas las inmunizaciones. Para la producción del mAb (+)METH P6, los ratones se inmunizaron subcutáneamente en los cuartos traseros con 100 µg del antígeno de (+)METH P6 emulsionado 1:1 (v/v) en adyuvante TiterMax (CytRx Corporation, Norcross, GA) y se reforzaron mensualmente con 50 µg del antígeno hasta que se alcanzó un título favorable. Para todas las otras inmunizaciones con antígeno, los ratones se
 5 inmunizaron inicialmente en los cuartos traseros subcutáneamente con 20-100 µg de antígeno emulsionado en adyuvante completo de Freund. La inmunización inicial fue seguida de un refuerzo con 20-50 µg de antígeno emulsionado en adyuvante incompleto de Freund tres semanas después, seguido de tres refuerzos a intervalos de seis semanas, hasta que se alcanzó un nivel de título favorable. Las muestras de suero se tomaron periódicamente mediante sangrado de la cola para medir IgG anti-(+)METH. Se midieron los títulos por ELISA
 10 (enzimoinmunoanálisis de adsorción) usando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con el conjugado de hapteno original con una proteína diferente. Por ejemplo, si el antígeno original era (+)METH-MO6-cBSA, se usó (+)METH-MO6 conjugada con tiroglobulina para evitar seleccionar anticuerpos reactivos con proteína portadora. El cribado para la respuesta de IgG anti-(+)METH se realizó por ELISA o un radioinmunoensayo de [³H]-(+METH (RIA), usando (+)METH y (+)AMP como inhibidores. Después de alcanzarse suficientes títulos de IgG anti-(+)METH,
 15 la tecnología de hibridomas convencional se utilizó como se ha descrito previamente (Valentine y col., 1994, J Pharmacol Exp Ther 269:1079-1085). El componente de fusión de hibridomas para los linfocitos B de ratón fue la línea celular P3X63Ag8.653 (Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA). El isotipo IgG y la identidad de cadenas ligeras se determinó con un kit de isotipado de anticuerpos de ratón (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN).

20
[0097] *Producción y purificación.* Se produjeron anticuerpos monoclonales en tanto un biorreactor de fibra hueca Cell-Pharm System 2500 (Valentine y col., 1996, J Pharmacol Exp Ther 278:709-716; Unisyn Technologies, Inc., Hopkinton, MA) como en un biorreactor de 10 litros Biostat B (Sartorius Corp, Edgewood, NY). Todos los anticuerpos se recogieron y se almacenaron a -80°C hasta purificación. Los mAb se purificaron tanto por cromatografía de
 25 afinidad usando proteína-G Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) como cromatografía de intercambio iónico usando SP Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) como se ha descrito en Hardin y col. (1998, J Pharmacol Exp Ther 285:1113-1122), o una combinación de los dos procedimientos. Tras la purificación, todos los anticuerpos se concentraron y el tampón se cambió a fosfato de sodio 15 mM que contenía cloruro sódico 150 mM (pH 6,5-7,5) como se ha descrito en McMillan y col. (2002, Behav Pharmacol 13:465-473).

30
[0098] *Determinación de la especificidad inmunoquímica.* Los perfiles de reactividad cruzada de cada mAb para metanfetamina, y compuestos estructuralmente relacionados y no relacionados, se determinaron por RIA de un modo similar al descrito por Owens y col. (1988, J Pharmacol Exp Ther 246:472-478). Un valor de CI₅₀ para la inhibición de la unión de [³H]-(+METH (y [³H]-(+AMP para el mAb generado contra el hapteno (+)METH MO10) se
 35 determinó para cada ligando después de ajustar una curva sigmoide a los puntos de datos. Los valores de K_D para mAb se determinaron mediante el procedimiento de Akera y Cheng (1977, Biochim Biophys Acta 470:412-423).

[0099] *Resultados.* Para estos estudios, los ligadores de hapteno se alargaron progresivamente de 4-10 átomos para aumentar las posibilidades de mayor interacción de las estructuras similares a METH con el sitio de unión a
 40 anticuerpo y para aumentar la flexibilidad del espaciador. Se supuso que un alargamiento progresivo del brazo espaciador conduciría a aumentos en la afinidad debido al acceso mejorado a la estructura similar a METH entera; y las diferentes conformaciones inmovilizadas provocarían anticuerpos que tienen diferente selectividad conformacional por compuestos similares a (+)METH.

45 **[0100]** Los haptenos se conjugaron con los grupos amino terminales de lisinas sobre todas las proteínas portadoras por química de carbodiimida, que forma un enlace peptídico con el ácido carboxílico disponible sobre el hapteno. Hubo 59 lisinas en albúmina de suero bovino, 20 en cada una de las cuatro subunidades de albúmina de
 50 huevo, e incluso estuvieron disponibles más sitios de conjugación sobre albúmina de suero bovino cationizada (es decir, Imject Supercarrier Immune Modulator). Sin embargo, no todas las lisinas o sitios de conjugación estuvieron disponibles en la superficie de la proteína para el acoplamiento a los haptenos. Experimentos de optimización preliminares mostraron que una relación de hapteno con respecto a proteína de 30:1 a 90:1 dio las mejores tasas de incorporación para las síntesis. Aunque la tasa de incorporación de hapteno para los antígenos no pudo determinarse precisamente, estudios de espectrofotometría de masas iniciales indicaron que uno de los 4 haptenos se conjugó con cada molécula de proteína (datos no mostrados).

55
[0101] Debido a que el objetivo primario fue seleccionar mAb de alta afinidad, la dosis de antígeno se mantuvo relativamente baja (por ejemplo, 10-20 µg). Aunque la inmunización con mayor dosis de hapteno-antígeno (por ejemplo, 50-100 µg) condujo algunas veces a mayores títulos, la afinidad por (+)METH fue frecuentemente demasiado baja. Así, normalmente se usó una dosis mínima de antígeno. Esta estrategia condujo rutinariamente a
 60 respuesta inmunológica en sólo el 40-70% de animales. En estudios más recientes se descubrió que un motivo primario de <100% de respuesta inmunológica fue la baja tasa de incorporación del hapteno sobre antígenos de proteína, que en parte fue vencido por el uso sensato de adyuvantes completo e incompleto de Freund para reforzar y sostener la respuesta inmunológica.

65 **[0102]** Cada suero de ratón de cada grupo de inmunizaciones se cribó rutinariamente (normalmente 6-10 ratones)

- después de cada refuerzo para determinar la madurez de la respuesta inmunitaria y las características inmunoquímicas relativas del suero policlonal (título, afinidad y especificidad). Para esto se usó un RIA de [3H]-(+)-METH. El ensayo de cribado siempre implicó inhibiciones de la unión de [3H](+)-METH con dosis crecientes de (+)-METH y (+)-AMP para determinar las afinidades relativas para cada ligando. La elección final de un ratón específico para su uso en generar hibridomas se basó principalmente en el animal con el mayor título y la afinidad por (+)-METH. A partir de este procedimiento de cribado de suero inmune, 3-10 anticuerpos monoclonales únicos se encontraron generalmente de cada fusión. Y, lo que es más importante, un antisuero policlonal que fue positivo para (+)-AMP no se descubrió hasta que se usó el hapteno MO10.
- 10 **[0103]** Para producir los hibridomas se eligieron ratones que había sido inmunizados con el adyuvante completo de Freund y reforzados con el adyuvante incompleto de Freund. La única excepción era las inmunizaciones con (+)-METH P6, que usaron TiterMax como adyuvante. En experimentos de optimización preliminares, las inmunizaciones con alumbre precipitaron antígenos, en varias ocasiones se probaron el adyuvante TiterMax y el adyuvante Ribí. Aunque estos adyuvantes produjeron generalmente títulos altos, se encontró que los anticuerpos de mayor afinidad se generaron con adyuvantes de Freund.

Ejemplo 2. Estudios de reactividad cruzada de MAb.

- [0104]** Después de cribar más de 25.000 posibles líneas celulares de hibridoma para la producción de mAb, cinco mAb con las características inmunoquímicas más favorables se estudiaron ampliamente para propiedades moleculares y eficacia preclínica (véase la Tabla 1). El resto de las líneas celulares de hibridoma se almacenaron congeladas en caso de necesidad futura. La selección de un mAb para prueba in vitro e in vivo más amplia se basó en el deseo de tener un intervalo de afinidades, un intervalo de especificidades de droga y un alto nivel de producción de mAb de la línea celular de hibridoma parental. Se necesitó este criterio final para aumentar la viabilidad de la producción de mAb a gran escala para la prueba in vivo. En la mayoría de los casos hubo uno o más mAb de afinidad o especificidad similar que se produjeron a partir de la misma fusión. Por ejemplo, las fusiones separadas que produjeron mAb6H4 y mAb4G9 (véase la Tabla 1) también produjeron mAb con prácticamente la misma afinidad y especificidad, pero secuencias de aminoácidos ligeramente diferentes. Estos dos anticuerpos particulares se eligieron debido a que la línea celular de hibridoma parental produjo significativamente más mAb.

Tabla 1. Estructura química de haptenos, el mAb resultante y valores de K_D para drogas clave

Estructura del hapteno	Nombre del hapteno	Nombre del mAb (isotipo y cadena ligera)	Psicoestimulantes clave		
			K_D (nM) de (+)-METH	K_D (nM) de (+)-AMP	K_D (nM) de (+)-MDMA
	(+)-METH P4	mAb6H8 (IgG ₁ κ)	250	41,000	106
	(+)-METH P6	mAb6H4 (IgG ₁ κ)	11	4000	4
	(+)-METH PO6	mAb6H7 (IgG _{2b} κ)	95	47,000	87
	(+)-METH MO6	mAb9B11 (IgG ₁ λ)	41	5000	123
	(+)-METH MO10	mAb4G9 (IgG _{2b} κ)	34	120 (51 nM con [³ H]-(+)-AMP)	140

Resultados

- 35 **[0105]** Se usó RIA para determinar el perfil de afinidad y reactividad cruzada relativa de cada mAb (Tablas 1 y 2). Sólo uno de los cinco haptenos generaron mAb con el potencial terapéutico deseado. La inmunización con el hapteno MO10 produjo la producción de mAb (mAb4G9) con unión de alta afinidad a (+)-METH, (+)-AMP y (+)-MDMA; poca o ninguna reactividad cruzada con isómeros similares a (-)-METH; y ninguna reactividad cruzada significativa con compuestos endógenos o medicaciones comunes estructuralmente similares (Tablas 1 y 2).

Tabla 2. Caracterización de las especificidades de unión de tres mAb anti-METH/MDMA o anti-METH/MDMA/AMP de prototipo importante.

Droga	Especificidad del anticuerpo (relación de CI_{50} como porcentaje) ^a			
	mAb6H4 (11 nM) ^b	mAb6H8 (250 nM) ^b	mAb4G9 (34 nM) ^b	mAb2F11
(+)METH	100%	100%	100%	100%
(+)AMP	0,1%	2,3%	34%	33%
(+)MDMA	125%	340%	29%	41%
(-)METH	3%	1,1%	10,2%	2,2%
(-)AMP	<0,1%	0,3%	6,3%	5,3%
(-)MDMA	0,7%	1,8%	1,1%	0,6%
(+)MDA	0,1%	2,4%	9,0%	tnd
(-)MDA	<0,1%	<0,1%	0,2%	tnd
4-OH-METH	58,8%	29,4%	10,6%	tnd
(+)pseudoefedrina	<0,1%	1,8%	0,4%	tnd
(+)norpseudoefedrina	<0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
l-fenilefrina	0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
(+)efedrina	<0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
(+)fenilpropanolamina	<0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
β -feniletilamina	<0,1%	<0,1%	0,1%	tnd
tiramina	<0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
dopamina	<0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
norepineferina	<0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
serotonina	<0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
epinefrina	<0,1%	<0,1%	<0,1%	tnd
^a relación de CI_{50} = (valor de RIA de CI_{50} para el valor de CI_{50} de METH/RIA para el ligando de prueba).				
Véase la Tabla 1 para las estructuras de los haptenos usados para generar estos anticuerpos.				
^b Valor de CI_{50} para la unión de METH de la Tabla 1.				
tnd: valor todavía no determinado				

[0106] Como mAb4G9 era el único de los cinco mAb elegido por reaccionar significativamente de forma cruzada con (+)AMP (Tablas 1 y 2), su afinidad por (+)AMP se examinó en más detalle. Para esto se realizó un análisis de RIA usando [3H]-(+AMP) (además de un RIA con [3H]-(+METH) y AMP como inhibidor. Estos datos mostraron que la afinidad real por AMP era 51 nM (Tabla 1), demostrando que este mAb tiene prácticamente el mismo valor de KD para AMP y METH. [3H]-(+MDMA) no estuvo disponible para determinar un valor de KD más preciso para la unión de (+)MDMA, pero parece probable que el valor de KD real sería significativamente inferior al valor indicado por la inhibición por MDMA de la unión de [3H]-(+METH) en RIA.

[0107] La unión del ligador del hapteno distal al centro quiral de la molécula dio una especificidad refinada por (+)-isómeros (Tabla 2). La longitud relativamente corta de los brazos espaciadores de haptenos (+)METH P4 y (+)METH P6 (ligadores de 4 y 6 carbonos, respectivamente), acoplados con uniones en el carbón para del anillo de fenilo de (+)METH (Tabla 1), impidió la flexibilidad de los haptenos. Esto forzó probablemente al sistema inmunitario a reconocer la presencia del grupo metilo sobre la molécula de nitrógeno de (+)METH y (+)MDMA y su ausencia en (+)AMP. Así, la afinidad de mAb fue alta para (+)METH y (+)MDMA, pero baja para (+)AMP. El hapteno (+)METH PO6, como (+)METH P6, se diseñó con un ligador unido al carbono para del anillo de fenilo, pero se incluyó un oxígeno para influir en la carga localizada y solubilidad e imitar la presencia de uno de dos átomos de oxígeno en las posiciones para y meta del grupo metilendioxi de (+)MDMA (Tabla 1). Un oxígeno unido a la estructura de anillo de fenilo se incluyó en dos otros haptenos, (+)METH MO6 y (+)METH MO10, pero los ligadores se unieron al carbono meta del anillo de fenilo de (+)METH. Esta estrategia se diseñó para presentar el oxígeno de la estructura similar a (+)MDMA a lo largo del mismo plano espacial que el centro quiral de la molécula de (+)METH. Se usó el espaciador de (+)METH MO10 para permitir más flexibilidad en el hapteno sobre la proteína con la esperanza de descubrir mAb con reconocimiento más amplio de estructuras similares a (+)METH. Estas estrategias combinadas produjeron el mejor equilibrio de afinidad y especificidad.

[0108] A partir de estos estudios se aprendió que 1) los ligadores localizados distales al centro quiral de esta molécula muy pequeña favorecen la generación de anticuerpos estereoespecíficos, 2) un brazo de ligador flexible más largo como (+)METH MO10 favorece la generación de anticuerpos con selectividad más amplia por compuestos similares a (+)METH, y 3) espaciadores ≥ 6 átomos producen mAb de mayor afinidad. Y, lo que es más importante, el descubrimiento de mAb4G9 no fue un acontecimiento aislado, ya que ya se han descubierto otros mAb derivados de MO10 con especificidades similares por (+)METH y (+)AMP.

Ejemplo 3. Análisis de secuencias de anticuerpos.

[0109] Para obtener un mejor entendimiento molecular de cómo la secuencia de aminoácidos primaria afectó la afinidad de mAb por (+)METH se analizaron rasgos de secuencias relacionadas y sin relacionar en cada región variable de mAb. Tres de las mAb fueron subclase IgG1 y dos fueron IgG2 (Tabla 1). Excepto el mAb9B11 anti-METH/MDMA (cadena ligera λ), todos los mAb poseyeron una cadena ligera κ .

[0110] Clonación y secuenciación de ADNc de mAb. Para estos estudios se analizaron cinco mAb anti-METH prototipo que oscilaron en afinidades de METH de 11 a 250 nM (Tabla 1). Se eligió un único mAb prototipo resultante de cada uno de los haptenos para estudios detallados. El ADNc de la cadena ligera (CL, singular y plural) del mAb se clonó por RT-PCR usando transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) con un cebador inverso exacto correspondiente al extremo C de la CL llamado MLEND1. Not (5'-GGG GCG GCC GCG CGT CTC AGG ACC TTT GTC TCT AAC-3') (SEC ID N°: 1). Las CL de mAb6H4, mAb6H8 y mAb6H7 se amplificaron en la dirección directa con el cebador degenerado ML2, y la CL de mAb4G9 se amplificó en la dirección 5' con el cebador degenerado ML4 (Coloma y col., 1992). La CL de mAb9B11 se amplificó en la dirección directa de la secuencia de cebadores 5'-ATGGCCTGGA(T/C)TTCACCTATACTCTCTCTCTCTGGCTCTC-3' (SEC ID N°: 2). El ADNc resultante se ligó de forma roma en el sitio SmaI del vector de clonación pGEM-3Z.

[0111] El ADNc de la cadena pesada de toda la IgG1 (de mAb (+)METH P4, (+)METH P6 y (+)METH MO6) se amplificó usando RT-PCR como se ha descrito anteriormente con un cebador inverso exacto con el extremo C de la cadena pesada, llamado MHEND. NotI 5' GGG GCG GCC GCA GGG CTC CAA GGA CAC TGG GAT CAT TT 3' (SEC ID N°: 3), y una mezcla de tres cebadores degenerados basados en los cebadores de MHALT de Coloma y col. (1992, J Immunol Methods 152:89-104). Los cebadores se modificaron de la secuencia originalmente publicada sólo por la sustitución de un sitio de restricción Nhe I con el sitio de restricción original. El mAb de IgG2 (de (+)METH PO6 y (+)METH MO10) se amplificó con el cebador inverso 5-CTCCCGGTCTCCGGTAAATGA-3' (SEC ID N°: 4).

[0112] La secuencia directa de la cadena pesada de mAb6H8 se amplificó con el cebador MHALT1 (Coloma y col., 1992, J Immunol Methods 152:89-104). Los cebadores directos para mAb6H4, mAb6H7, mAb9B11 y mAb4G9 se diseñaron a partir de los resultados de la secuenciación del extremo N de las proteínas maduras (véase la Fig. 1A y B para las secuencias de proteínas). Las secuencias de cebadores usadas fueron: 5'-GAGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTAGC-3' (SEC ID N°: 5) para mAb6H4, 5'-GATGTAAAACCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTCAAACCTTCTCAGTC-3' (SEC ID N°: 6) para mAb6H7, 5'-GAGGTGCAGCTCCGGAGTCAGGACCTAGC-3' (SEC ID N°: 7) para mAb9B11 y 5'-GAGTACCAGCTCCAGCAGTCTGGGAC-3' (SEC ID N°: 8) para mAb4G9. Entonces, el ADNc se ligó de forma roma en el sitio Sma I del vector de clonación pGEM-3Z. Los plásmidos resultantes de toda la clonación de mAb se transformaron en la cepa DH5 α de E. coli y se secuenciaron en el Laboratorio de secuenciación del núcleo de ADN de Ciencias médicas de la Universidad de Arkansas.

[0113] Todas las secuencias se enviaron a la base de datos GenBank. Los números de acceso asignados por GenBank para los siguientes anticuerpos se enumeran aquí entre paréntesis (cadena ligera, cadena pesada): mAb6H8 (DQ381551, DQ381550), mAb6H4 (DQ381543, DQ381542); mAb6H7 (EF392838, EF392837), mAb9B11 (EF392840, EF392839) y mAb4G9 (EF392842, EF392841). El uso de la línea germinal de los diferentes mAb se determinó comparando las secuencias de ADN con aquellas en la base de datos IMGT usando las herramientas V-QUEST del programa basado en la web (dirección de internet: <http://imgt.cines.fr>) y por examen visual de las secuencias (Giudicelli y col., 2004, Nuc Acid Res 32:W435-440).

[0114] Resultados. Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la región variable del mAb se presentan en la Fig. 2. Un análisis de regiones determinantes de la complementariedad reveló un alto grado de diversidad en tanto composición como longitud. Las CDR de la primera cadena ligera (L1) variaron en longitud de 10-14 residuos, y con la excepción de mAb4G9, poseyeron un gran número de residuos de serina (Fig. 2B). El único residuo conservado en CDR de L1, o cualquiera de las CDR de la cadena ligera, fue la serina en la posición L26. Las CDR de L2 tuvieron 7 residuos de longitud, excepto para mAb6H7, que sólo poseyó 5 aminoácidos. Las CDR de L3 tuvieron todos 9 residuos de longitud, excepto mAb4G9 que tuvo 10 residuos. Las CDR de las cadenas pesadas (Fig. 2A) presentaron longitudes similares en las CDR de H1 y H2, pero poca homología. La CDR de H1 tuvo una treonina conservada en la posición H30 y tanto un triptófano como tirosina en la posición H33. Las CDR de H3 se diferenciaron en la longitud de 8-16 residuos. Aunque no es inmediatamente evidente del alineamiento, las regiones H3 poseyeron dos residuos de tirosina separados cinco residuos, con la segunda tirosina antes del triptófano en H103.

[0115] Aunque las comparaciones de secuencias de CDR son importantes, diferencias en CDR pueden atribuirse a diferencias en secuencias de la línea germinal de genes de regiones V particulares, y a mutación somática dentro de las CDR de estos genes de la región V. Para entender mejor la importancia relativa de las mutaciones de la línea germinal y somáticas, los genes secuenciados se analizaron usando la base de datos IMGT (Giudicelli y col., 2004, Nuc Acid Res 32:W435-440). El análisis mostró que cada anticuerpo era único y no clónico. Es decir, en vez de proceder de una disposición de genes de la línea germinal temprana en el desarrollo de linfocitos B, se produjeron de acontecimientos de recombinación V(D)J únicos. Entonces, estas transposiciones de la línea germinal únicas experimentaron mutaciones de ADN somáticas, que fueron frecuentemente silenciosas, pero algunas produjeron cambios de aminoácidos que se diferenciaron del gen de la línea germinal original. Así, no se encontró un claro patrón de respuesta.

[0116] Este análisis de secuencias esclareció diferencias de secuencias únicas en las CDR de anticuerpo. Una característica común fue una prolina conservada en la posición 95 o 95a de todas las regiones CDR de L3, excepto mAb9B11 (Fig. 2B), que tuvo un residuo de serina. Debido a su capacidad para formar "bisagras", los residuos de prolina frecuentemente confirieron flexibilidad a las secuencias de proteínas de la cadena principal. Esta prolina/serina fue inmediatamente seguida tanto de un aminoácido hidrófobo (es decir, leucina o valina como en mAb6H4 y mAb9B11, respectivamente) como de un residuo aromático. Es posible que estos residuos pudieran ser importantes para la interacción con el anillo de fenilo de compuestos similares a (+)METH mediante interacciones hidrófobas o pi-pi, y la prolina precedente podría dar flexibilidad para adaptarse a diferentes conformaciones.

Ejemplo 4. Modelado molecular y acoplamiento molecular.

[0117] Basándose en los resultados del alineamiento primario de secuencias, tres mAb (mAb6H4, mAb6H8 y mAb4G9) se eligieron para el modelado estructural. Cada CDR se asignó y se le dio una clasificación canónica (Al-Lazikani y col., 1997, J Mol Biol 273:927-948), excepto las CDR de H3, que no poseen clases canónicas.

[0118] Modelado y análisis estructural de regiones variables de IgG. El modelado molecular de la estructura tridimensional de las regiones variables de tres de los mAb se realizó usando el algoritmo de modelado de anticuerpos WAM (Whitelegg y Rees, 2000, Protein Eng 13:819-824). Se eligieron mAb6H4, mAb6H8 y mAb4G9 para análisis más detallado debido a que presentaron el intervalo completo de afinidades por (+)METH y un amplio intervalo de especificidades de ligando por otras drogas similares a METH importantes. Las secuencias de aminoácidos primarias de las regiones variables de la CP (cadena pesada) y CL se enviaron primero al sitio de modelado de anticuerpos WAM para el alineamiento. El programa alineó las secuencias contra secuencias conocidas en la base de datos y buscó clases canónicas de regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Basándose en estas clasificaciones, el programa asignó una estructura tridimensional a las regiones estructurales y CDR ajustando la cadena principal a la de las estructuras conocidas más próximas.

[0119] Acoplamiento molecular de ligandos. Para la simulación del acoplamiento molecular se usó el programa FlexX (Tripos). Primero se identificó un bolsillo profundo en la superficie de separación de las CDR a partir de cálculos de modelado superficial y electrostáticos en Pymol (Delano Scientific, San Carlos, CA) y Sybyl (Tripos). Para definir esta región como un sitio activo putativo se seleccionaron los residuos dentro de un área de 6 Å alrededor de F L94 (para mAb6H4) o Y L94 (para mAb4G9). Al ligando de METH se asignaron cargas formales por Sybyl y se confirió flexibilidad parcial a la molécula. El programa se estableció para encontrar las 30 mejores conformaciones de acoplamiento molecular y devolver éstas en una tabla de puntuación consenso.

[0120] Resultados. Los modelos tridimensionales presentaron conformación plegada de hoja β de anticuerpos clásica (Fig. 3). En general, todos los modelos mostraron conformidad con limitaciones geométricas en todas las estructuras. El análisis indica que menos del 2% de los residuos tuvieron ángulos Ψ y Φ de la cadena principal en regiones atípicas. Pareció que los tres modelos se ajustaron razonablemente bien a todas las características y limitaciones estructurales de la proteína, y presentaron una base apropiada para realizar el análisis de acoplamientos moleculares base.

[0121] Todas las CDR se encontraron dentro de las clases canónicas, excepto L3 de mAb4G9 y CDR de H3, que no tienen clases canónicas. Se predijo que las CDR de H3 de los tres anticuerpos formaron un pliegue u "horquilla", en vez de la conformación extendida. La comparación de los modelos reveló elementos estructurales conservados y algunas diferencias potencialmente importantes en las desviaciones de la raíz cuadrada media (RMSD) de las configuraciones de bucle de CDR (Fig. 3). La estructura de bucle de mAb6H4 se eligió arbitrariamente como punto de referencia para comparar las diferencias de los otros dos anticuerpos, debido a que tuvo la mayor afinidad por (+)METH. Las CDR de L2 de los tres anticuerpos ocuparon casi las mismas posiciones espaciales. Las regiones L3 de mAb6H4 y mAb6H8 fueron muy similares, aún cuando se diferenciaron en la afinidad por (+)METH aproximadamente 25 veces.

[0122] Basándose en los resultados de modelado, la simulación de los acoplamientos moleculares se realizó con mAb6H4 y mAb4G9. Según los modelos (Fig. 4) se formó un bolsillo profundo por la interacción de los bucles de CDR de H1, H2, L1 y L3 para ambos anticuerpos, con un bolsillo más amplio formado en la región de unión de

mAb4G9 debido a una CDR de H3 más corta. Se creó un acoplamiento molecular teórico de (+)METH en estos bolsillos de mAb y se identificaron residuos dentro de 8 angstroms del ligando como sitios posibles para la interacción ligando-mAb (Fig. 4). Los resultados de este acoplamiento molecular basado en FlexX indicaron que la molécula de METH se orientó generalmente con el grupo fenilo hidrófobo hacia el interior del bolsillo. En mAb6H4 y mAb4G9, el nitrógeno cargado de METH estuvo en estrecha proximidad a una histidina en la posición L32 y H35, respectivamente.

[0123] Basándose en los análisis de modelado molecular, la superficie de separación entre (+)METH y el mAb fue relativamente pequeña (el área superficial de (+)METH es 174 Å²) con pequeños desplazamientos en la conformación de proteínas que producen grandes cambios en la unión. Como puede apreciarse en la Fig. 3, las desviaciones más llamativas aparecieron en la región CDR de H3, con más de 6 Å y 7 Å de RMSD en mAb6H8 y mAb4G9, respectivamente. La diversidad en las posiciones de la CDR sugiere que cada uno de estos anticuerpos presentó un paradigma de unión para drogas similares a (+)METH que era algo independiente de la configuración de bucle. La representación de superficie tridimensional de los modelos expuso un bolsillo profundo en la superficie de separación de CDR de mAb6H4. Este bolsillo pareció tener aproximadamente el tamaño de (+)METH y probablemente acomodaría el acoplamiento molecular del ligando. Por el contrario, el posible bolsillo de unión de mAb4G9 era más ancho y más poco profundo. Se supone que el brazo de ligador más largo de (+)METH MO10 combinado con el ángulo diedro cambiado de un oxígeno en la posición meta del anillo de fenilo contribuyó a la formación de un bolsillo mayor. El análisis indica que sólo cinco de los seis bucles de seis CDR podrían participar directamente en la unión de drogas similares a (+)METH, mostrando L2 poco contracto. La simulación del acoplamiento molecular de (+)METH con FlexX indicó que los posibles bolsillos de enlace estuvieron dominados por los residuos aromáticos con algunos capaces de hacer puentes de hidrógeno (es decir, histidina y tirosina).

Ejemplo 5. mAb anti-(+)METH alteran la farmacocinética de (+)METH en ratas.

[0124] La capacidad de mAb anti-(+)METH6H4 (generado contra el hapteno (+)METH P6, véase la Tabla 1) para alterar las concentraciones en el cerebro de (+)METH se examinó en dos modelos diferentes de abuso de (+)METH (Byrnes-Blake y col., 2005, Eur J Pharmacol 521:86-94).

[0125] El modelo de sobredosis se diseñó para imitar a un toxicómano que toma una alta dosis iv de (+)METH y se trata con mAb (+)METH en el servicio de urgencias. En este modelo, las ratas recibieron 1 mg/kg de (+)METH (iv) seguido 30 min después de una dosis de mAb anti-(+)METH. El modelo de pretratamiento con mAb se diseñó para imitar a un toxicómano en el tratamiento con droga administrada con una medicación de mAb anti-(+)METH al principio de la terapia de modificación del comportamiento que recae al uso de (+)METH. En este modelo, las ratas se pretrataron con mAb anti-(+)METH6H4 y recibieron una dosis iv de 1 mg/kg de (+)METH al día siguiente. Esta dosis (sin mAb) produjo aproximadamente 2,5 h de efectos locomotores. Las ratas (3/momento de tiempo) se sacrificaron en varios momentos después de la administración de (+)METH para determinar concentraciones en el cerebro de (+)METH. mAb6H4 disminuyó las concentraciones en el cerebro de (+)METH en ambos modelos. De hecho, las concentraciones en el cerebro de (+)METH en ambos modelos fueron prácticamente superponibles en tiempos comparables después de 30 min - el tiempo de administración de mAb en el modelo de sobredosis. Ambos estudios muestran claramente que los anticuerpos contra (+)METH pueden reducir significativamente las concentraciones en el cerebro de (+)METH con el tiempo.

[0126] A continuación se determinó la semivida "funcional" de cada uno de los mAb anti-(+)METH anteriormente mencionados (véase la Tabla 1). Este ensayo "funcional" comparó concentraciones de (+)METH en ausencia y presencia de mAb. Por esta medida, los mejores anticuerpos son aquellos con los mayores y más largos aumentos en las concentraciones de (+)METH y (+)AMP en suero. Primero, se determinó que las propiedades farmacocinéticas del mAb no fueron diferentes (resultados no mostrados). Por ejemplo, todos tuvieron una semivida en suero de aproximadamente 7-8 días, que descartó la posibilidad de que uno o más de ellos fueran rápidamente eliminados y, así, inactivados por eliminación. También mostró el potencial para producir una terapia anti-(+)METH de acción prolongada por inmunización pasiva o activa.

[0127] Para realizar los estudios "funcionales", ratas macho (n=4/grupo) fueron administradas con infusiones de (+)METH continuas de 14 días a 5,6 mg/kg/día por minibombas osmóticas sc. Después de alcanzar las concentraciones en estado estacionario de (+)METH (a 24 h), cada rata se trató con una dosis de mAb que fue equimolar en sitios de unión a la carga corporal en estado estacionario de (+)METH. Sólo una dosis única de mAb se administró en este momento de tiempo, pero (+)METH se infundió continuamente a una tasa del 50% de la carga corporal por hora para mantener un estado estacionario de (+)METH. Las muestras en suero se recogieron antes del mAb y en momentos de tiempo después de la administración de mAb. Todos los mAb anti-(+)METH produjeron aumentos significativos en las concentraciones de (+)METH en suero en comparación con controles antes del mAb. Sin embargo, hubo diferencias sustanciales en las curvas de concentración de (+)METH en suero frente al tiempo para los cinco mAb (Fig. 5, símbolos blancos). La mayoría de los mAb anti-(+)METH parecieron estar parcialmente inactivados a grados diferentes con el tiempo, como se juzgó por su incapacidad para mantener altas concentraciones de (+)METH en suero con el tiempo. Esta inactivación fue particularmente sorprendente para mAb6H4 de mayor afinidad (KD =11 nM). Sin embargo, mAb4G9 ((+)METH y (+)AMP, KD = 34 y 51 nM,

respectivamente) todavía fue muy eficaz después de aproximadamente 2 semanas. También fue el único mAb que mantuvo concentraciones significativamente elevadas de (+)AMP (círculos rellenos) y (+)METH (círculos blancos) con el tiempo en comparación con concentraciones antes de mAb (símbolos cuadrados con "A" y "M" dentro).

5 **[0128]** Se supuso originalmente que la afinidad de mAb fue la fuerza impulsora primaria para la eficacia terapéutica. Sin embargo, estos estudios revelaron que disminuyó la duración de la acción y la función del mAb anti-
 (+)METH in vivo, mientras que la farmacocinética de proteínas de mAb no fueron diferentes (valores de t1/2, eliminación y volumen de distribución similares). Esto fue imprevisto. La primera generación de haptenos (por
 10 ejemplo, (+)METH P6 y (+)METH P4) se diseñaron deliberadamente para producir mAb específico para (+)METH, con prácticamente ninguna reactividad cruzada con (+)AMP. Cuando se produjo la segunda generación de haptenos (por ejemplo, (+)METH MO10), se descubrió que el mAb resultante, con especificidad por (+)METH y (+)AMP, tuvo ventajas clínicamente importantes de duración elevada de la acción y eficacia.

[0129] Por ejemplo (véase la Figura 7 y 8), mAb4G9 altera sustancialmente la disposición de AMP, a diferencia de
 15 mAb6H4 (generado por el hapteno P6). Como se muestra en la Fig. 8, mAb4G9 reduce tanto las concentraciones de METH como de AMP en el cerebro, que es médicamente importante. También reparte AMP en el suero de otros compartimentos (Figura 7). mAb6H4 tiene un efecto mínimo o no tiene efecto sobre AMP en tanto cerebro como suero debido a que no es ampliamente específico in vivo.

20 **[0130]** Además, mAb4G9 tiene una semivida funcional más larga que el mAb generado por haptenos previos. La Figura 7 muestra que mAb6H4 tienen significativamente menos funcionalidad in vivo (niveles en suero elevados de METH/AMP es una indicación de actividad) en el momento de tiempo 24 h. A diferencia, mAb4G9 mantiene concentraciones de METH y AMP en suero significativamente elevadas 24 h después de la administración, que indica funcionalidad in vivo prolongada.

25

Ejemplo 6. Ensayos de comportamiento

[0131] Se examinaron los efectos in vivo de mAb4G9 usando un modelo de discriminación de droga. Pareció que
 mAb4G9 era un antagonista eficaz y de larga duración de efectos de METH en este modelo (Figura 6A). El mAb4G9
 30 (600 mg/kg) desplazó las curvas de respuesta a dosis durante al menos 7 días. En el primer y segundo día después del tratamiento con mAb, la curva de respuesta a dosis se desplazó aproximadamente 4 a 6 veces. Cuando se probó de nuevo 7 días después del tratamiento con mAb4G9, la curva de respuesta a dosis todavía estaba desplaza aproximadamente 2,5 veces.

35 **[0132]** Los inventores también probaron la capacidad de mAb4G9 para bloquear la auto-administración de (+)AMP en un modelo en el que ratas respondieron bajo un paradigma de intervalo fijo (60 s) para una dosis de 0,03 mg/kg de (+)AMP por infusión. Como se muestra en la Figura 6B, el número de inyecciones de (+)AMP por sesión se redujo significativamente después de la administración de mAb4G9 (100 mg/kg). Así, mAb4G9 redujo espectacularmente la respuesta a (+)AMP. Estos estudios sugieren que un único mAb podría ayudar a prevenir la
 40 recaída al uso de (+)METH y/o (+)AMP.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 **[0133]**

<110> the Board of Trustees of the University of Arkansas Owens, S. Michael Funnell, Melinda Carroll, F. Ivy

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN SELECTIVAMENTE METANFETAMINA Y COMPUESTOS SIMILARES A METANFETAMINA

50

<130> 117780

<150> US 60/813.917

<151> 15-06-2006

55

<150> US 60/913.124

<151> 20-04-2007

<160> 26

60

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 36

65

<212> ADN

ES 2 415 655 T3

<213> Artificial

<220>
<223> RATÓN

5

<400> 1
ggggcggccg cgcgtctcag gacctttgtc tctaac 36

<210> 2
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> RATÓN

15

<400> 2
atggcctgga tcttcaacta tactctctct cctggctctc 40

20

<210> 3
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

25

<220>
<223> RATÓN

<400> 3
ggggcggccg cagggtcca aggacactgg gatcattt 38

30

<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>
<223> RATÓN

<400> 4
ctcccgtct cgggtaaata ga 22

40

<210> 5
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

45

<220>
<223> RATÓN

50

<400> 5
gagtcagct tcaggagtca ggacctagc 29

<210> 6
<211> 50
<212> ADN
<213> Artificial

55

<220>
<223> RATÓN

60

<400> 6
gatgtaaatac ttcaggagtgc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc 50

65

<210> 7
<211> 30

ES 2 415 655 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> RATÓN

<400> 7
 gaggtgcagc ttccggagtc aggacctagc 30

10 <210> 8
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> RATÓN

<400> 8
 gaggaccagc tccagcagtc tgggac 26

20 <210> 9
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Asp Ser Phe Gly Gly Ser Tyr Asp Gly Phe Tyr Ser Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30

ES 2 415 655 T3

<400> 10

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Val Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Asp Tyr Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Lys Ser Val Ser Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser
 85 90 95

Tyr Phe Asp Ser Asp Asp Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser
 115

- 5 <210> 11
- <211> 115
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

10 <400> 11

ES 2 415 655 T3

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Gly
 20 25 30

Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Leu Gly Met Ile Trp Asp Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ser Ser Val Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe
 65 70 75 80

Leu Lys Met Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Thr Leu Tyr Thr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115

<210> 13

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 13

Glu Tyr Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 415 655 T3

Leu Tyr Gly Asn Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser
 115

<210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 14

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Arg Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ile Asn Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 100 105

<210> 15
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<400> 15

15

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

ES 2 415 655 T3

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Phe Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 16

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

10

<210> 17

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 17

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

ES 2 415 655 T3

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Ala Gly Ala Val Thr Ala Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Ile Arg Ala Pro Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Val Leu Trp Phe Ser Asn
 85 90 95

His Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Leu
 100 105 110

<210> 18

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 18

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Phe
 20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Asn Leu Leu Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

10

<210> 19

<211> 446

ES 2 415 655 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

5

Glu Tyr Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Leu Tyr Gly Asn Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
 165 170 175
 Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro
 180 185 190
 Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
 210 215 220

ES 2 415 655 T3

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
 245 250 255

Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val
 260 265 270

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 275 280 285

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala
 290 295 300

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
 340 345 350

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
 355 360 365

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
 370 375 380

Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
 405 410 415

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
 420 425 430

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 20

<211> 1341

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 20

ES 2 415 655 T3

gagtatcagc tgcagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc cgggggcttc agtgaagatg 60
 tcttgcaagg cctctggcta cacctttacc aactactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggcggt atttatcctg gaaatagtga tactacctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccaccag cactgcctac 240
 atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcggtct attactgtct atatggtaac 300
 tacgactttg actactgggg ccaaggcacc actctcagag tctctcagc caaaacaaca 360
 gccccatcgg tctatccact ggccccctgtg tgtggagata caactggctc ctcggtgact 420
 ctaggatgcc tgggtcaaggg ttatttccct gagccagtga ccttgacctg gaactctgga 480
 tcctgtcca gtggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacacctc 540
 agcagctcag tgactgtaac ctcgagcacc tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg 600
 gccaccctgg caagcagcac caaggtggac aagaaaattg agcccagagg gccacaatc 660
 aagccctgtc ctccatgcaa atgccagca cctaacctct tgggtggacc atccgtcttc 720
 atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat agtcacatgt 780
 gtggtggtgg atgtgagcga ggatgacca gatgtccaga tcagctggtt tgtgaacaac 840
 gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag tactctccgg 900
 gtggtcagtg ccttccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc 960
 aaggtcaaca acaaagacct cccagcgcgc atcgagagaa ccatctcaa acccaaaggg 1020
 tcagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag aagaagagat gactaagaaa 1080
 caggtcactc tgacctgcat ggtcacagac ttcatgcctg aagacattta cgtggagtgg 1140
 accaacaacg ggaaaacaga gctaaactac aagaacactg aaccagtctt ggactctgat 1200
 ggttcttact tcatgtacag caagctgaga gtggaaaaga agaactgggt ggaaagaaat 1260
 agctactcct gttcagtggt ccacgagggt ctgcacaatc accacacgac taagagcttc 1320
 tcccggactc cgggtaaatg a 1341

<210> 21

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 415 655 T3

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser His Asp Val Asn Lys Phe
 20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Thr Asn Leu Leu Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
 100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
 115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
 130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
 145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 22
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 22

5

ES 2 415 655 T3

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60
atcacttgca aggcaagcca tgacgttaac aagtttatag cttggtacca acacaagcct 120

ggaaaaggtc ctaggctgct catacattac acatctacat tacagccagg catcccatcg 180
aggttcagtg gcagtgggto tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggaacct 240
gaagatattg caacttatta ttgtctacag tataactaatc ttctaccgtg gacgttcggt 300
ggaggcacca agctggaaat caaacgggct gatgetgcac caactgtatc catcttccca 360
ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 420
taccctaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc 480
ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaa gacagcacct acagcatgag cagcacctc 540
acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 600
acatcaactt caccattgt caagagcttc aacaggaatg agtggttag 648

<210> 23
<211> 1359
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 23

5

ES 2 415 655 T3

gagtaccagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc cgggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cctctggcta cacctttacc agctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggcggg atttatcctg gaaatagtga tactacctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccaccag cactgcctac 240
 atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcggtct attactgtct atatggtaac 300
 tacgactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc caaaacaaca 360
 cccccatcag tctatccact ggcccctggg tgtggagata caactgggtc ctccgtgact 420
 ctgggatgcc tgggtcaaggg ctacttccct gagtcagtga ctgtgacttg gaactctgga 480
 tcctgtcca gcagtgtgca caccttccca gctctcctgc agtctggact ctacactatg 540
 agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggccaagtc agaccgtcac ctgcagcgtt 600
 gctcaccag ccagcagcac cacggtggac aaaaaacttg agcccagcgg gccatttca 660
 acaatcaacc cctgtcctcc atgcaaggag tgtcacaat gccagctcc taacctcgag 720
 ggtggaccat ccgtcttcat cttccctcca aatatcaagg atgtactcat gatctccctg 780
 acaccaagg tcacgtgtgt ggtggtggat gtgagcgagg atgaccaga cgtccagatc 840
 agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac acagctcaga cacaaccca tagagaggat 900
 tacaacagta ctatccgggt ggtcagcacc ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt 960
 ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac aaagacctcc catcacccat cgagagaacc 1020
 atctcaaaaa ttaaagggct agtcagagct ccacaagtat acatcttgcc gccaccagca 1080
 gagcagttgt ccaggaaaga tgtcagtctc acttgcttgg tcgtgggctt caaccctgga 1140
 gacatcagtg tggagtggac cagcaatggg catacagagg agaactaca ggacaccgca 1200
 ccagtcttgg actctgacgg ttcttacttc atatatagca agctcaatat gaaaacaagc 1260
 aagtgggaga aaacagattc cttctcatgc aacgtgagac acgaggtct gaaaaattac 1320
 tacctgaaga agaccatctc ccggtctccg ggtaaatga 1359

- <210> 24
- <211> 648
- 5 <212> ADN
- <213> Mus musculus
- <400> 24

ES 2 415 655 T3

gacgtccaga tgacacagtc tccatcctcg ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60
atcacttgca aggcaagcca agacattaac aagtttatag cttggtacca acacaagcct 120
ggaaaaggtc ctaggctgct catacattac acatctacat tacagccagg catcccatcg 180
aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggaacct 240
gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgctaate ttctaccgtg gacgttcggt 300
ggaggcacca agctggaaat caaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 360
ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 420
taccocaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aatggcgctc 480
ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcacctc 540
acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggg cactcacaag 600
acatcaactt caccocattgt caagagcttc aacaggaatg agtggttag 648

<210> 25
<211> 452
<212> PRT
<213> Mus musculus

5

<400> 25

Glu Tyr Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

10

ES 2 415 655 T3

Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
305 310 315 320

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro
325 330 335

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val
370 375 380

Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn
405 410 415

Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val
420 425 430

Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 26
<211> 215
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Phe
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

5

10

ES 2 415 655 T3

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Asn Leu Leu Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
 100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
 115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
 130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
 145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 165 170 175

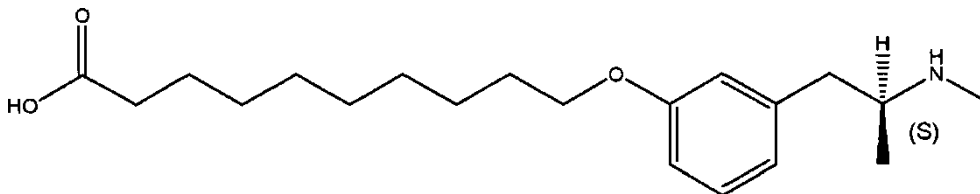
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que reconoce cada compuesto del grupo que consiste en (+)anfetamina, (+)metanfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina, obtenible usando un agente inmunizante que comprende la fórmula



2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo tiene una relación de Cl_{50} de inferior al 15% para cada compuesto del grupo que consiste en (-)anfetamina, (-)metanfetamina y (-)3,4-metilendioximetanfetamina en el cual la relación de Cl_{50} es la relación de Cl_{50} para (+)metanfetamina en presencia de (+)metanfetamina marcada con respecto a Cl_{50} para un ligando de prueba en presencia de (+)metanfetamina marcada.

3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 ó 2, en el cual el anticuerpo tiene una relación de Cl_{50} superior al 20% para cada compuesto del grupo que consiste en (+)anfetamina, (+)metanfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina, en el cual la relación de Cl_{50} es la relación de Cl_{50} para (+)metanfetamina en presencia de (+)metanfetamina marcada con respecto a Cl_{50} para un ligando de prueba en presencia de (+)metanfetamina marcada.

4. El anticuerpo monoclonal de cualquier reivindicación precedente, en el cual el anticuerpo tiene una relación de Cl_{50} inferior al 12% para cada compuesto del grupo que consiste en (-)anfetamina, (-)metanfetamina y (-)3,4-metilendioximetanfetamina, en el cual la relación de Cl_{50} es la relación de Cl_{50} para (+)metanfetamina en presencia de (+)metanfetamina marcada con respecto a Cl_{50} para un ligando de prueba en presencia de (+)metanfetamina marcada.

5. El anticuerpo monoclonal de cualquier reivindicación precedente, en el cual el anticuerpo tiene una relación de Cl_{50} superior al 25% para cada compuesto del grupo que consiste en (+)anfetamina, (+)metanfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina, en el cual la relación de Cl_{50} es la relación de Cl_{50} para (+)metanfetamina en presencia de (+)metanfetamina marcada con respecto a Cl_{50} para un ligando de prueba en presencia de (+)metanfetamina marcada.

6. El anticuerpo monoclonal de cualquier reivindicación precedente, en el cual la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25 y la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26.

7. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el cual la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19 y la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21.

8. El anticuerpo monoclonal de cualquier reivindicación precedente, en el cual el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo murino, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo recombinante y un fragmento de anticuerpo.

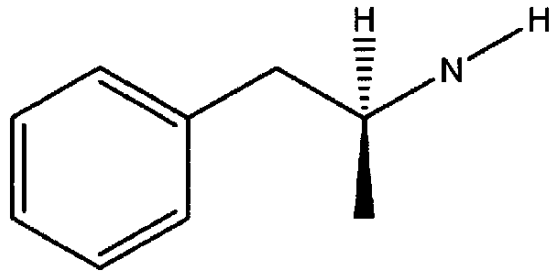
9. Un anticuerpo monoclonal según cualquier reivindicación precedente para su uso en terapia.

10. Un anticuerpo monoclonal según cualquier reivindicación precedente para su uso en un procedimiento de tratamiento del uso de drogas en un sujeto, en el cual el anticuerpo monoclonal disminuye la concentración de (+)anfetamina, (+)metanfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina en el cerebro del sujeto.

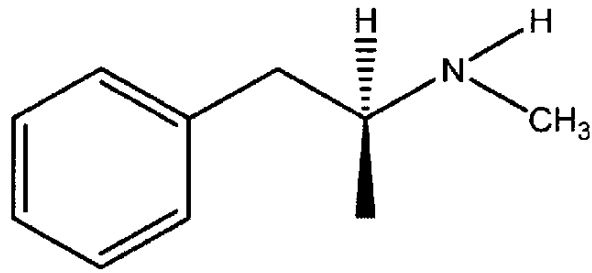
11. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 10, en el cual el sujeto está seleccionado del grupo que comprende un roedor, un primate no humano y un ser humano.

12. Un ensayo para detectar la presencia de al menos un compuesto en una muestra seleccionada del grupo de compuestos que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina, comprendiendo el ensayo poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 y detectar la asociación del anticuerpo monoclonal en la muestra con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en (+)metanfetamina, (+)anfetamina y (+)3,4-metilendioximetanfetamina.

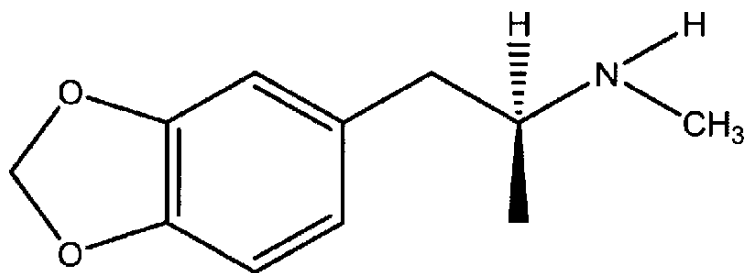
13. El ensayo de la reivindicación 12, en el cual la muestra es una muestra biológica o una muestra química.
14. El ensayo de la reivindicación 12 ó 13, en el cual la asociación se detecta por un medio seleccionado del grupo que consiste en ELISA, ensayo inmunocromatográfico y ensayo de inmunoprecipitación.
- 5 15. Un kit, en el cual el kit comprende un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.



(+)Anfetamina



(+)Metanfetamina



(+)-3,4-Metilendioximetanfetamina

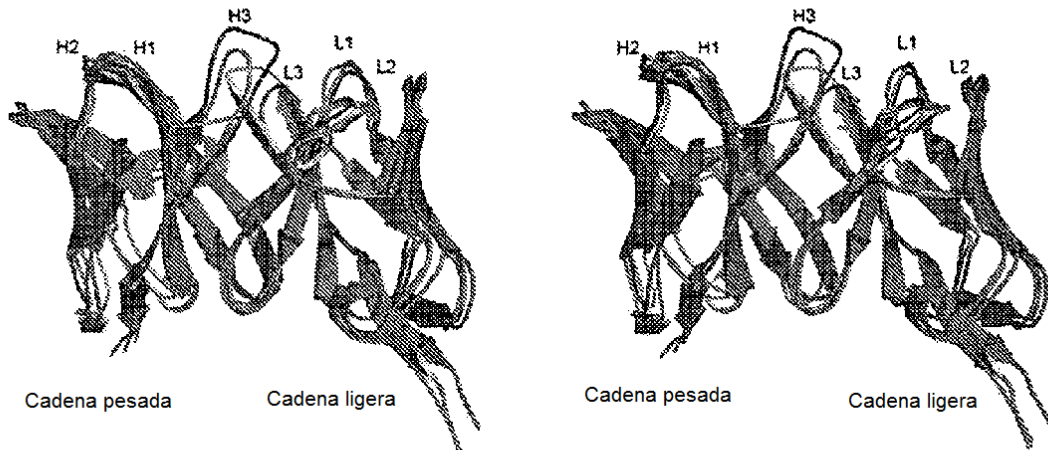
FIG. 1

MAb	KD	nombre (nM)	FR1	CDR H1	FR2
6H8	250	QVQLQQP	GAELVKP	GGASMKL	SCKASGYTFTS
6H4	10	EVQLQES	GP	SLVKPSQT	LSLTCSVTGDS
6H7	41	DVKLQES	GPGLVKP	SQSLSLT	CSVTGSSITSA
9B11	41	EVQLPES	GPGLVAP	SQSLSITC	TVSGFSLTDG
4G9	40	EYQLQQS	GTVLAR	PGASVKM	SCKASGYTFTS
					YWMH - WVKQ
					RPGGLEWIGG
					FR2
					CDR H2
6H8	250	INP	NGRNK	YNEKFK	NKATLTVDK
6H4	10	IS	YRGST	YINP	SLKSRISITR
6H7	41	IRYDGY	NN	YNP	SLKNRISITR
9B11	41	IW	DDGD	TDYSS	VLKSRLSITK
4G9	40	IYPGN	SDTT	YINQ	FKGKAKLTA
					VTSSTAYMEL
					SSLSLTNED
					SAVYYCYG
					NY
					FR3
					CDR H3
6H8	250	GG	YDGF	YSMD	YWGGG
6H4	10	DD	YAME	Y	WGGG
6H7	41	DE	AY	WGGG	TLVTVS
9B11	41	YT	YAMD	Y	WGGG
4G9	40	DF	DY	WGGG	ITLTVS
					SEC ID N°: 9
					SEC ID N°: 10
					SEC ID N°: 11
					SEC ID N°: 12
					SEC ID N°: 13
					FR4

FIG. 2A

6H8	250	FR1	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTIS	27	FR2	YMYWYQQKPKPWIYR	27	FR3	LASGVPARFSGSGGTSY
6H4	10		QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITC	28		YSSSHLYWYQQKPKLW	28		YVSTSNLASGVPARFSGSGGTSY
6H7	41		QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITC	29		WYQQKPKPSSPKLW	29		YVSTSNLASGVPARFSGSGGTFY
9B11	41		QAVVTQESA-LTTSPTGETVITC	30		YANWVQEKPDHLFTGL	30		IGGTNIRAPGIPARFSGSLIGDKA
4G9	40		DVQMTQSPSSLSASLGKVTITC	31		YQHKPKGKPRLLIHY	31		TSITLQPGIPSRFSGSGGRDY
6H8	250	CDR L1	SASSS - VS -	32	CDR L2	YMYWYQQKPKPWIYR	32	CDR L3	LASGVPARFSGSGGTSY
6H4	10		SASSS - VSSSHLYWYQQKPKLW	33		YSSSHLYWYQQKPKLW	33		YVSTSNLASGVPARFSGSGGTSY
6H7	41		SASSSVRSSLY - WYQQKPKPSSPKLW	34		WYQQKPKPSSPKLW	34		YVSTSNLASGVPARFSGSGGTFY
9B11	41		RSSAGAVTASN YANWVQEKPDHLFTGL	35		YANWVQEKPDHLFTGL	35		IGGTNIRAPGIPARFSGSLIGDKA
4G9	40		KASODINKFIA - - WYQHKPKGKPRLLIHY	36		YQHKPKGKPRLLIHY	36		TSITLQPGIPSRFSGSGGRDY
6H8	250	FR3	SLTIINMEAEEDAATYQCQHYHSYP	37	FR4	YMYWYQQKPKPWIYR	37	FR5	LASGVPARFSGSGGTSY
6H4	10		SLTISSMEAEEDAASYFCHQWSSFP	38		YSSSHLYWYQQKPKLW	38		YVSTSNLASGVPARFSGSGGTSY
6H7	41		SLTISSMEAEEDAASYFCHQWSSYP	39		WYQQKPKPSSPKLW	39		YVSTSNLASGVPARFSGSGGTFY
9B11	41		ALTIITGAQTEDEAIYFCVLFWSNHSV	40		YANWVQEKPDHLFTGL	40		IGGTNIRAPGIPARFSGSLIGDKA
4G9	40		SFSISNLEPEDIATYCYCLOYANLLPW	41		YQHKPKGKPRLLIHY	41		TSITLQPGIPSRFSGSGGRDY

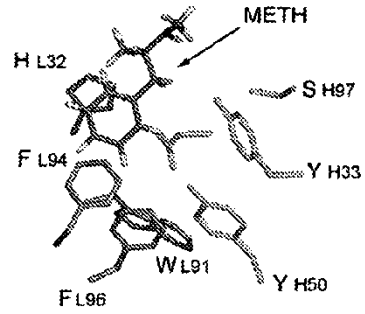
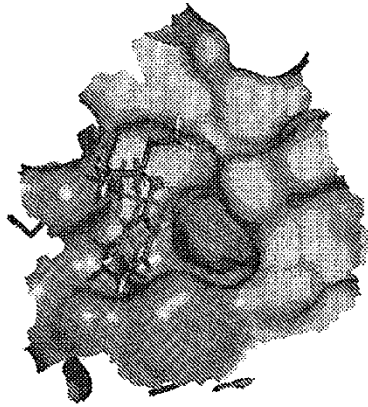
FIG. 2B



Nombre de mAb	Regiones CDR y RMSD (Å) de mAb6H4					
	L1	L2	L3	H1	H2	H3
mAb6H8	2,27	0,84	0,67	1,85	3,36	6,67
mAb4G9	2,44	0,88	3,72	1,39	3,59	7,22

FIG. 3

mAb6H4



mAb4G9

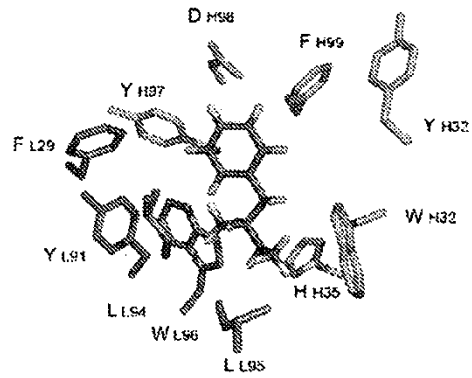
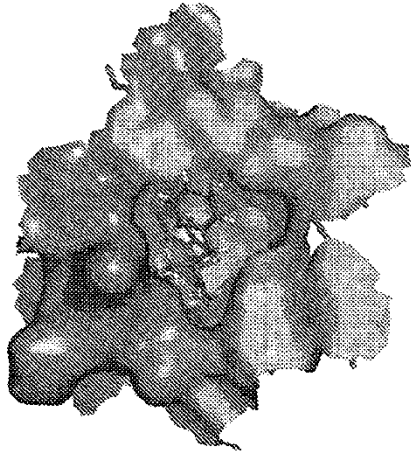


FIG. 4

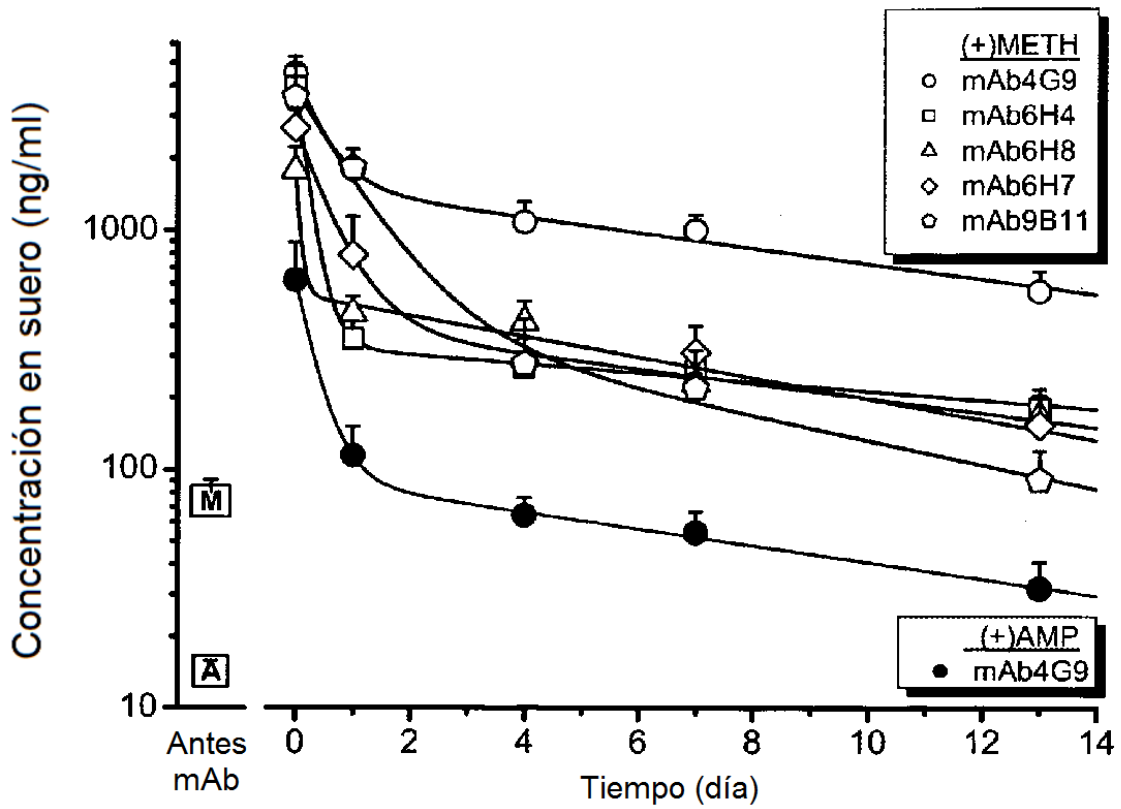


FIG. 5

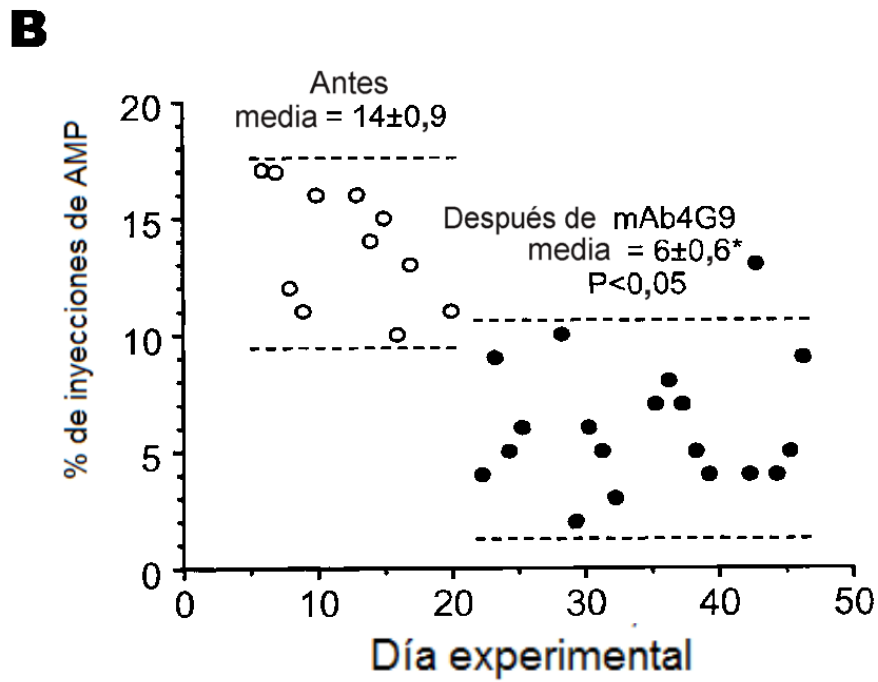
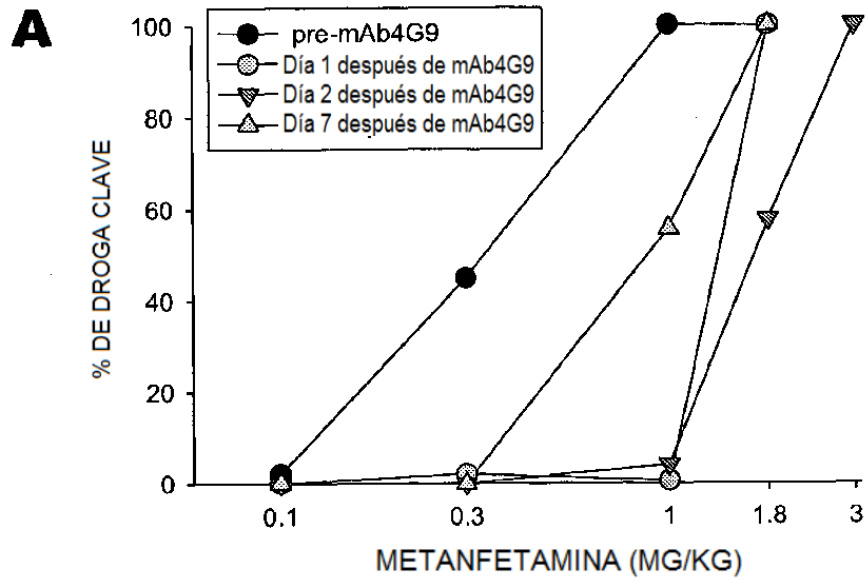


FIG. 6

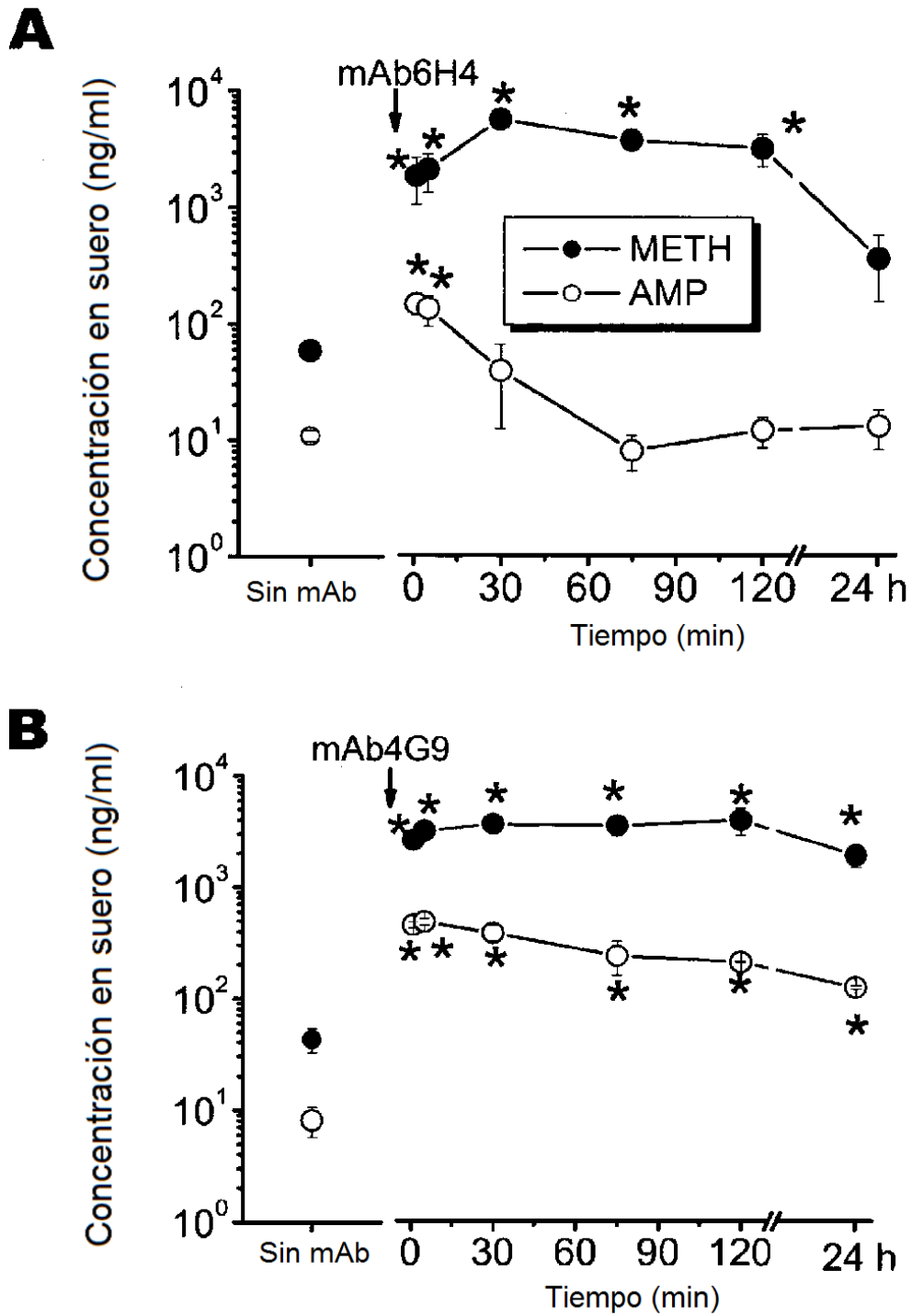
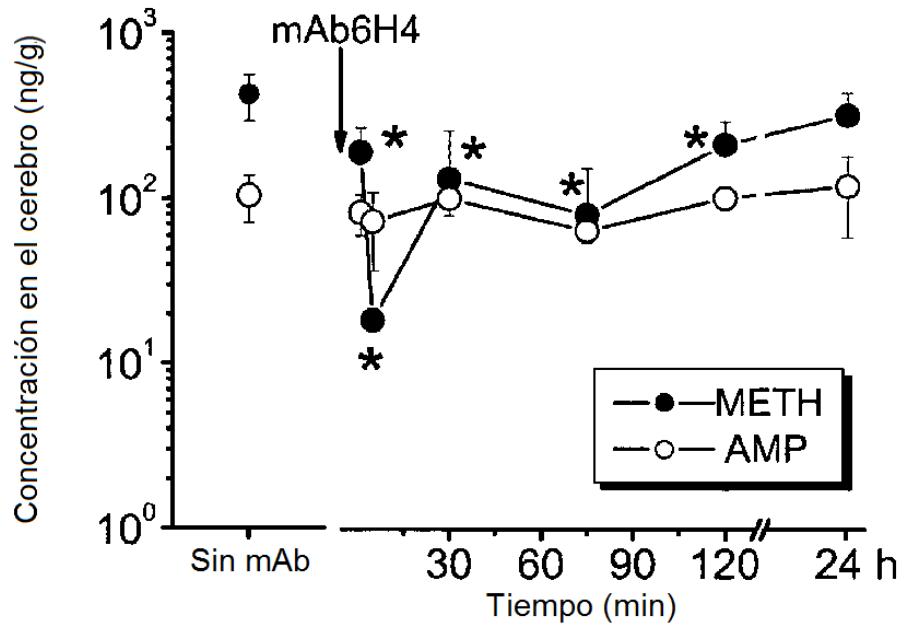


FIG. 7

A



B

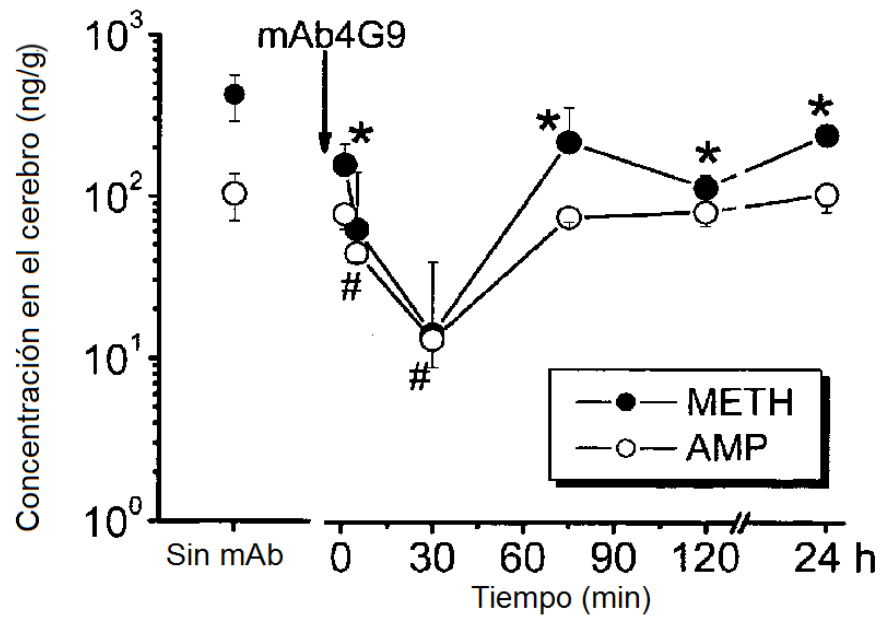


FIG. 8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4816567 A [0052] [0057]
- US 5545807 A [0058]
- US 5545806 A [0058]
- US 5569825 A [0058]
- US 5625126 A [0058]
- US 5633425 A [0058]
- US 5661016 A [0058]
- US 5160701 A [0061]
- US 5141850 A [0061]
- US 5451504 A [0061]
- US 5415994 A [0061]
- US 5559041 A [0061]
- US 5328828 A [0063]
- US 60813917 B [0133]
- US 60913124 B [0133]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- KABAT ; WU. *J Immunol*, 1991, vol. 147, 1709-1719 [0008]
- KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0045]
- GODING. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, 1986, 59-103 [0047]
- KOZBOR. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0048]
- BRODEUR et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0048]
- HARLOW ; LANE. *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0052]
- PETERSON et al. *The AAPS Journal*, 2006, vol. 8 (2), E383 [0055]
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0056] [0057]
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0056]
- PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0056]
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0057]
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0057]
- HOOGENBOOM ; WINTER. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0058]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0058]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77 [0058]
- BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0058]
- MARKS et al. *BiolTechnology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0058]
- LONBERG et al. *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0058]
- MORRISON. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0058]
- FISHWILD et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0058]
- NEUBERGER. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0058]
- LONBERG ; HUSZAR. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0058]
- Antibodies. HARLOW ; LANE. Cold Spring Harbor. 1988 [0061]
- HOOVER, JOHN E. *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Co, 1975 [0069]
- *Pharmaceutical Dosage Forms*. Marcel Decker, 1980 [0069]
- Goodman & Goldman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 1996, 1707-1711 [0073]
- Goodman & Goldman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 2001, 475-493 [0073]
- BYRNES-BLAKE et al. *Int Immunopharmacol*, 2001, vol. 1, 329-338 [0093]
- BYRNES-BLAKE. *Eur J Pharmacol*, 2003, vol. 461, 119-128 [0095]
- VALENTINE. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, vol. 269, 1079-1085 [0096]
- VALENTINE. *J Pharmacol Exp Ther*. Unisyn Technologies, Inc, 1996, vol. 278, 709-716 [0097]
- HARDIN et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, vol. 285, 1113-1122 [0097]
- MCMILLAN et al. *Behav Pharmacol*, 2002, vol. 13, 465-473 [0097]
- OWENS et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988, vol. 246, 472-478 [0098]
- AKERA ; CHENG. *Biochim Biophys Acta*, 1977, vol. 470, 412-423 [0098]
- COLOMA et al. *J Immunol Methods*, 1992, vol. 152, 89-104 [0111] [0112]
- GIUDICELLI et al. *Nuc Acid Res*, 2004, vol. 32, W435-440 [0113] [0115]

- **AL-LAZIKANI** et al. *J Mol Biol*, 1997, vol. 273, 927-948 [0117]
- **WHITELEGG ; REES**. *Protein Eng*, 2000, vol. 13, 819-824 [0118]
- **BYRNES-BLAKE** et al. *Eur J Pharmacol*, 2005, vol. 521, 86-94 [0124]