

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 733**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009** **E 09159094 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 2246703**

54 Título: **Inmunoensayo de salvinorinas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2013

73 Titular/es:

RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
Ardmore, 55 Diamond Road
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB

72 Inventor/es:

BENCHIKH, ELOUARD;
FITZGERALD, STEPHEN PETER;
LOWRY, ANDREW PHILIP y
MCCONNELL, ROBERT IVAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 415 733 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

Inmunoensayo de salvinorinas

Antecedentes de la invención

5 El diterpenoide salvinorina A, es un potente componente psicoactivo de la planta mexicana indígena *Salvia divinorum* utilizada en medicina por los indios mazatecos para el tratamiento de dolores de cabeza, artritis y anemia (Valdes et al., 1983). La actividad sobre el SNC de esta molécula no nitrogenada se atribuye a su fuerte afinidad por el receptor de opiáceos kappa (abreviadamente en lo sucesivo KOR por la expresión inglesa *kappa opioid receptor*) (Roth et al., 2002). Su uso como una droga recreativa está aumentando debido a su fácil disponibilidad y potente actividad. La ingestión de *S. divinorum* o salvinorina A (de aquí en adelante, la referencia al uso o ingestión de salvinorina A incluye implícitamente *S. divinorum* se realiza generalmente masticando la hoja, ingiriendo un extracto líquido de las hojas o inhalación su humo. Sus efectos sobre el SNC y propiedades alucinógenas han sido comparados con los del LSD, lo que lleva a su situación ilegal en muchos países. El KOR ha sido implicado en la nocicepción y en una serie de procesos morbosos, y hay gran interés en el ingrediente activo de *S. divinorum*, salvinorina A (y sus análogos) como un tratamiento potencial para diversos estados, incluyendo diarrea, trastornos del estado de ánimo y en la regulación del dolor (Vortherms and Roth, 2006). El uso de salvinorina A y análogos como un tratamiento potencial de episodios maníacos se describe en WO 2005/089745; US 2006/0058264 describe salvinorina A y análogos como compuestos útiles para fines de investigación farmacológica y para el tratamiento de enfermedades; US 2006/0083679 propone el uso de salvinorina A y análogos como medicamentos o como sondas químicas en los procedimientos de diagnóstico, tales como tomografía de emisión de positrones (abreviadamente, PET por la expresión inglesa *Positron Emission Tomography*), tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (abreviadamente SPECT por la expresión inglesa *Single-Photon Computerized Tomography*) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (abreviadamente NMR, por la expresión inglesa *Nuclear Magnetic Resonance*). Este interés ha dado lugar a la síntesis y al estudio farmacológico de diversos análogos de salvinorina. Más recientemente, se ha demostrado que derivados de éter en C-9 de salvinorina A son más activos y tienen una mayor semivida que la salvinorina A. Este desarrollo ha generado interés en la comunidad de investigación científica con respecto a potenciales nuevos fármacos terapéuticos, aunque se desconocen las consecuencias sociales más amplias del abuso de tales moléculas activas potentes sobre el SNC.

La acción de corta duración de la salvinorina A (aproximadamente 10-15 minutos) indica un rápido metabolismo a una forma inactiva. Estudios farmacocinéticos de Hooker et al., (2008) que utilizaron PET apoyaron la rápida absorción y la corta duración de acción de salvinorina A. Se especula que el análogo hidroxilado en C-9, salvinorina B, es el metabolito principal formado por hidrólisis mediada por esterasa (Yan and Roth 2004; Schmidt et al., 2005a). Los estudios realizados por Schmidt et al., (2005a, 2005b) en el plasma de mono no fueron concluyentes, puesto que el estudio *ex vivo* identificó salvinorina B como metabolito, mientras que el estudio *in vivo* no detectó salvinorina B. Pichini et al., (2005) no pudieron detectar salvinorina A en saliva, sudor u orina de pacientes 1,5 horas después de haber fumado la droga, lo que sugiere o bien la eliminación rápida o un extenso metabolismo. Tsujikawa et al., (2009), en un estudio metabólico *in vitro* con plasma de rata, identificaron salvinorina B y ácido 1,4a-dimetil-1-[2-(3-furanil)-2-hidroxietil]-7-hidroxi-5-metoxicarbonil-8-oxodecahidronaftaleno-2-carboxílico como los principales metabolitos. Por lo tanto, aunque hay una cada vez más pruebas de que salvinorina B es el principal metabolito de salvinorina A, además de los metabolitos propuestos por Tsujikawa, es probable que haya todavía metabolitos no identificados. Para facilitar un método de detección robusto que identifique el uso de salvinorina A, son necesarios medios para detectar no sólo los marcadores reconocidos, tales como salvinorina A precursora y el metabolito en C-9, salvinorina B, sino también metabolitos todavía no identificados. Además este método debe ser altamente sensible a la salvinorina A, un marcador inequívoco del uso de salvinorina. Un análisis comparativo de la vía metabólica de otras drogas psicoactivas con estructuras moleculares similares, métodos de ingestión y propiedades farmacológicas permite predicciones de otros metabolitos posibles de la salvinorina A. El metabolismo de la droga por lo general implica la formación de sustancias más polares para facilitar la excreción. Esto ocurre a través de oxidación en una primera fase (en la sangre) mediada por las enzimas citocromo P450 y glucuronidación en una segunda fase de (en el hígado). Las similitudes estructurales y farmacológicas de salvinorina A y Δ^9 -THC, así como sus métodos similares de ingestión, sugieren que los datos metabólicos derivados de la investigación de Δ^9 -THC podrían ser un indicador útil de los productos probablemente metabólicos de la salvinorina A. Un metabolito de Δ^9 -THC es el alcohol primario 11-hidroxi- Δ^9 -THC, formado por oxidación del grupo metilo unido al grupo alqueno del sistema heterocíclico.

El alcohol primario se oxida adicionalmente al principal metabolito de Δ^9 -THC, ácido 11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxílico que también experimenta glucuronidación. La cocaína y la heroína, drogas potentes que actúan sobre el SNC, al igual que la salvinorina A, posee cada una dos funcionalidades éster y se podría esperar que las vías metabólicas de los tres fármacos mostraran similitudes. La cocaína y la heroína son metabolizadas por carboxilesterasas humanas (hCE), enzimas expresadas en diversos órganos, incluyendo hígado, intestinos y pulmones (Imai et al., 2006). Basándose en evidencia científica comparativa y en las propiedades farmacológicas de la salvinorina A y sus análogos, el ácido salvinorina-A-7-carboxílico y ácido salvinorina-B-7-carboxílico, son potenciales metabolitos de la salvinorina A.

Se han ideado varios métodos de análisis para detectar y cuantificar la salvinatorina A y sus análogos en *S. divinorum* (Grundmann et al., 2007). Además del estudio en plasma de rata de Tsujikawa, la detección en fluidos animales se ha limitado a la detección de salvinatorina A y salvinatorina B. Schmidt et al., (2005a) usaron HPLC-MS para detectar salvinatorina A y salvinatorina B en muestras de plasma de monos *ex vivo*. Dichos autores describieron que la salvinatorina B no podía ser claramente detectada en muestras *in vivo*. Pichini et al., (2005) usaron cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para analizar orina, saliva y sudor de dos individuos que habían fumado hojas de *S. divinorum*. Como se ha descrito anteriormente, la salvinatorina A, se detectó en orina en las primeras 1,5 horas (el límite de detección fue 5 ng/mL). Después de 1,5 horas, la técnica no detectó salvinatorina A en orina o saliva, probablemente limitada por la sensibilidad del ensayo. McDonough et al., (2008) desarrollaron un método de HPLC-MS para detectar y cuantificar la salvinatorina A en fluidos biológicos humanos estableciendo como irreproducibles los métodos descritos anteriormente. El método tenía un límite de detección de 2,5 ng/mL y un límite de cuantificación de 5,0 ng/mL. Dichos autores sugirieron también que debido a la rápida desaparición de la salvinatorina A, era deseable la identificación de un metabolito de la sustancia activa principal.

Es evidente que los formatos de ensayo existentes para la detección de la salvinatorina A son inadecuados, pues usan un equipo costoso que tiene una baja sensibilidad para la salvinatorina A y por lo tanto, una ventana limitada de detección después de la ingestión de salvinatorina A. Además, estos ensayos no se dirigen a la detección de nuevos y futuros análogos sintéticos de mayor estabilidad y actividad que la salvinatorina A.

Bibliografía

- Grundmann O. et al., (2007). *Planta Med.*, 73: 1046.
- 20 Hooker J.M. et al., (2008). *Neuroimage*, 41: 1044-1050.
- Imai, T. et al., (2006). *Drug Metab Dispos.*, 34: 1734-1741.
- McDonough et al., P.C. (2008). *J. Anal. Toxicol*, 32: 417-421.
- Pichini S et al., (2005). *Rap. Commun. Mass Spectr.*, 19: 1649-1656.
- Roth B.L. et al., (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 11934-11939.
- 25 Schmidt M.S. et al., (2005a). *J. Chromatography B*, 818: 221-225.
- Schmidt, M.D. et al. (2005b). *Synapse*, 58: 208-210.
- Valdes, L.J. et al., (1983). *J. Ethnopharmacol*, 7: 287-312.
- Vortherms T.A. and Roth, B.L. (2006). *Molec. Intervent*, 6: 257-265.
- Tsujikawa K., et al., (2009). *Xenobiotica*, 39: 391-398.
- 30 Yan F. and Roth B.L. (2004), *Life Sci.*, 75: 2615-2619.

Sumario de la invención

La invención proporciona una disolución a los problemas relacionados con la detección y la determinación analítica de la salvinatorina A, sus análogos y metabolitos en el área de desarrollo de fármacos terapéuticos y uso de drogas ilícitas. "Detección" significa el análisis cualitativo de presencia o ausencia. "Determinación" significa el análisis cuantitativo de la cantidad. El suministro de anticuerpos altamente sensibles y genéricos producidos contra nuevos inmunógenos permite métodos y kits analíticos basados en anticuerpos que,

- son más de 100 veces más sensible para la salvinatorina A que los métodos analíticos existentes.
- permiten la detección y determinación de análogos activos de la salvinatorina A, tales como 9-metoximetil-salvinatorina B.
- 40 • permiten la detección y determinación de metabolitos de la salvinatorina A, tal como la salvinatorina B.

Hasta ahora no se ha desarrollado un método altamente sensible y relativamente sencillo para detectar la ingestión de salvinatorina A por el análisis *in vitro* de muestras biológicas humanas. Por otra parte, la investigación terapéutica ha identificado ya, y continuará identificando análogos altamente activos de la salvinatorina A, que explotará el consumidor de drogas recreativas. Por tanto, también se requieren métodos para detectar la próxima generación de fármacos basados en salvinatorina A. En la presente memoria, se describen los primeros métodos de inmunoensayo y kits para la salvinatorina A, sus metabolitos y análogos.

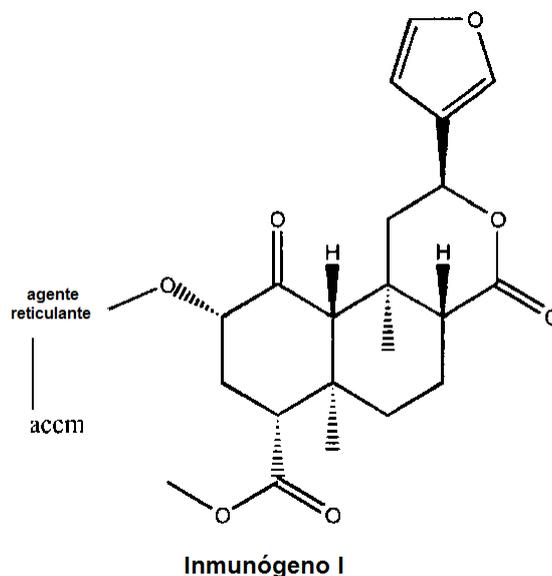
Figuras

La Figura 1 representa la síntesis de salvinatorina A-7-hemisuccinato (hapteno A)

La Figura 2 representa el inmunógeno Ia y el hapteno B

Descripción detallada de la invención

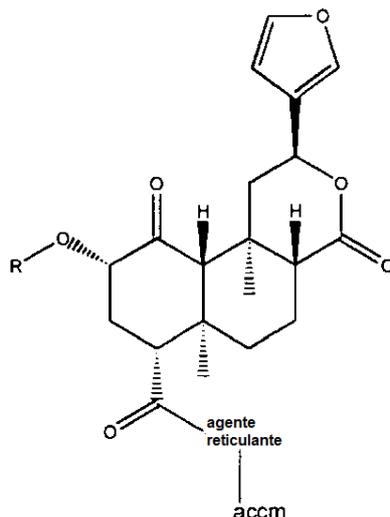
- 5 En un primer aspecto, la presente invención describe un método para detectar o determinar salvinatorina A, salvinatorina B y análogos en C-9 de salvinatorina A y salvinatorina B en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un conjugado y con al menos un anticuerpo, producido contra el inmunógeno I, siendo dicho anticuerpo capaz de unirse a al menos un epítipo estructural de salvinatorina A, salvinatorina B y análogos en C-9 de salvinatorina A, detectar el conjugado unido, y deducir a partir de una curva de calibración la presencia, o la
- 10 cantidad, de salvinatorina A, salvinatorina B y análogos en C-9 de salvinatorina A y salvinatorina B, donde la estructura del inmunógeno I es:



- donde accm es un material portador que confiere antigenicidad y el agente reticulante une el átomo de O en C-9 del anillo tricíclico fusionado al accm. El agente reticulante es preferentemente de la estructura $-(X)_n-Y-Z-$, donde $n = 0$ o 1, y si X está presente, es preferiblemente carbonilo, tiocarbonilo, oxicarbonilo u oxitiocarbonilo; Y es preferiblemente un resto alquileo saturado o de cadena lineal sustituida o no sustituida de C_{1-10} , más preferiblemente de C_{2-6} o un resto arileno; Z (antes de la conjugación con el material portador que confiere antigenicidad) es preferiblemente un resto de carboxi, ditiopiridilo, maleimida, amino, hidroxilo, tiol, tioéster o aldehído, más preferiblemente un resto de carboxi o amino; en una realización preferida de la invención, el método implica el uso del inmunógeno salvinatorina B-9S-hemisuccinato-NH-BTG (Inmunógeno I de la Figura 2). Los agentes reticulantes para uso en la formación del inmunógeno uniendo haptenos a los materiales portadores que confieren antigenicidad son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los agentes reticulantes son bien conocidos por los expertos en la técnica, y frecuentemente constan de una cadena sustituida o no sustituida de 2-10 átomos, que pueden o no incorporar sistemas de anillos. Por análogos en C-9 se entiende moléculas de la estructura de la salvinatorina A o salvinatorina B con modificación sólo en la posición C-9.
- 15
- 20
- 25

- También se describe un método para detectar o determinar salvinatorina A y salvinatorina B en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un conjugado y con al menos un anticuerpo producido contra el inmunógeno I que es capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinatorina A y salvinatorina B, detectar el conjugado unido, y deducir a partir de una curva de calibración la presencia o la cantidad de salvinatorina A y salvinatorina B.
- 30

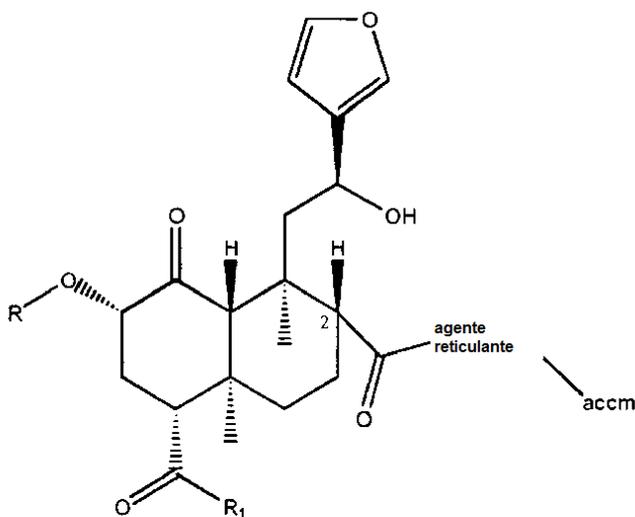
- Un aspecto adicional de la invención es un método para detectar o determinar salvinatorina A y/o salvinatorina B y análogos en C-7 de salvinatorina A y/o salvinatorina B en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un conjugado y con al menos un anticuerpo producido contra el inmunógeno II que es capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinatorina A y/o salvinatorina B y análogos en C-7 de salvinatorina A y/o salvinatorina B, detectar el conjugado unido, y deducir a partir de una curva de calibración la presencia o la cantidad de salvinatorina A y/o salvinatorina B y análogos en C-7 de salvinatorina A y/o salvinatorina B, donde la estructura del inmunógeno II es:
- 35



Inmunógeno II

en donde R = H o acetilo; accm es un material portador que confiere antigenicidad y el agente reticulante une el grupo carbonilo en C-7 del anillo tricíclico fusionado al accm, el agente reticulante es $-(X)_n-Y-Z-$, donde $n = 0$ o 1 , y si X está presente, es preferiblemente un heteroátomo seleccionado de O, S y N que se une al grupo carbonilo unido en C-7 del anillo fusionado tricíclico; Y es preferiblemente un resto alquileo saturado o de cadena lineal sustituida o no sustituida de C_{1-10} , más preferiblemente de C_{2-6} o un resto arileno; Z (antes de la conjugación con el material portador que confiere antigenicidad) es preferiblemente un resto de carboxi, ditiopiridilo, maleimida, amino, hidroxilo, tiol, tioéster o aldehído, más preferiblemente un grupo carboxi o un grupo amino. Por análogos en C-7 se entiende moléculas de la estructura de la salvinorina A o salvinorina B con modificación sólo en la posición C-7. Un hapteno se define como una molécula no inmunogénica y para el propósito de esta patente incluye salvinorina A, salvinorina B y sus derivados con o sin el agente reticulante.

Otro aspecto de la invención es un método para detectar o determinar metabolitos de salvinorina A y salvinorina B en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un conjugado y con al menos un anticuerpo producido contra el inmunógeno III, siendo dicho anticuerpo capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de metabolitos de salvinorina A y salvinorina B, en los que se ha abierto los anillos de lactona de los metabolitos de salvinorina A y salvinorina B, detectar el conjugado unido, y deducir a partir de una curva de calibración, la presencia o la cantidad, de los metabolitos de salvinorina A y salvinorina B en los que se ha los anillos de lactona de salvinorina A y salvinorina B, donde la estructura de Inmunógeno III es:



Inmunógeno III

en donde R = H o acetilo y R₁ = OH o CH₃-O-, accm es un material portador que confiere antigenicidad y el agente reticulante une el grupo carbonilo en C-2 del anillo de decahidronaftaleno al accm; el agente reticulante es -(X)_n-Y-Z-, donde n es 0 o 1 y si X está presente, es preferiblemente N, O o S; Y es preferiblemente un resto alquileo saturado o de cadena lineal sustituida o no sustituida de C₁₋₁₀, más preferiblemente de C₁₋₆ o un resto arileno; Z (antes de la conjugación con el material portador que confiere antigenicidad) es preferiblemente un resto de carboxi, ditiopiridilo, maleimida, amino, hidroxilo, tiol, tioéster o aldehído, más preferiblemente un grupo carboxi o un grupo amino.

El método, dependiendo de los sustituyentes R y R₁ del inmunógeno, detecta o determina preferiblemente el ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-5-metoxicarbonil-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico, el ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-5-carboxi-7-hidroxi-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico, el ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-7-acetoxi-5-carboxi-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico o el ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-7-acetoxi-5-metoxicarbonil-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico.

El conjugado del método es bien conocido por los expertos en la técnica, y es una molécula que incorpora o está unida a un elemento detectable, siendo dicha molécula capaz de unirse a un anticuerpo producido contra un inmunógeno descrito en los métodos de la invención. El conjugado, cuando incorpora un agente marcador, puede ser una sustancia radiactiva. El agente marcador de un conjugado, al que está unida la molécula, es preferiblemente una enzima, más preferiblemente una peroxidasa, más preferiblemente peroxidasa de rábano silvestre (abreviadamente HRP por la expresión inglesa *Horseradish Peroxidase*). Cuando se estimula de un modo relevante, cambia la radiación electromagnética emitida por el agente marcador y este cambio se detecta y, opcionalmente, se mide. Para HRP, el cambio en la radiación electromagnética es la emisión de luz visible producida por una reacción química (quimioluminiscencia).

El agente reticulante usado en los métodos de la invención antes de la conjugación es preferiblemente anhídrido succínico o aminoetanoato de terc-butilo. Preferiblemente, el accm es una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son seroalbúmina bovina (abreviadamente BSA por la expresión inglesa *bovine serum albumin*), ovoalbúmina de huevo, gamma-globulina bovina, tiroglobulina bovina (abreviadamente BTG por la expresión inglesa *bovine thyroglobulin*), hemocianina de lapa bocallave (abreviadamente KLH por la expresión inglesa *keyhole limpet hemocyanin*), etc. Alternativamente, se pueden emplear poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, al igual que otros materiales polímeros naturales o sintéticos que lleven grupos funcionales reactivos. En particular, pueden conjugarse al hapteno para producir un inmunógeno, carbohidratos, levaduras o polisacáridos.

La invención también describe anticuerpos producidos contra los inmunógenos I, II y III, siendo los anticuerpos producidos contra el inmunógeno I capaces de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinorina A, salvinorina B y análogos en C-9 de salvinorina A y salvinorina B, y siendo los anticuerpos producidos contra el Inmunógeno II capaces de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinorina A y/o salvinorina B y análogos en C7 de salvinorina A y/o salvinorina B, y siendo los anticuerpos producidos contra el Inmunógeno III capaces de unirse con al menos un epítipo estructural de ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-5-metoxicarbonil-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico, ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-5-carboxi-7-hidroxi-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico, ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-7-acetoxi-5-carboxi-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico o el ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-7-acetoxi-5-metoxicarbonil-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico.

La invención describe además un kit para detectar o determinar salvinorina A, salvinorina B y análogos en C-9 de salvinorina A y salvinorina B, incluyendo el kit al menos un anticuerpo producido contra el Inmunógeno I que es capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinorina A, salvinorina B y análogos en C-9 de salvinorina A.

Además, la invención describe un kit para detectar o determinar salvinorina A y/o salvinorina B y análogos en C-7 de salvinorina A y/o salvinorina B, incluyendo el kit al menos un anticuerpo producido contra el Inmunógeno II que es capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinorina A y/o salvinorina B y análogos en C-7 de salvinorina A y/o salvinorina B.

Además, la invención describe un kit para detectar o determinar metabolitos de salvinorina A y salvinorina B en los cuales se ha abierto el anillo de lactona de salvinorina A y salvinorina B, incluyendo el kit al menos un anticuerpo producido contra el Inmunógeno III que es capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de metabolitos de salvinorina A y salvinorina B en los que se ha abierto el anillo de lactona de salvinorina A y salvinorina B.

El(los) kit(s) de la invención puede(n) incluir opcionalmente instrucciones de uso para detectar los analitos diana en una muestra *in vitro*. Preferiblemente, la muestra es una disolución, tal como un fluido biológico. Más preferiblemente, la muestra es suero, plasma u orina.

Preferiblemente, el conjugado y la salvinorina A, sus análogos y metabolitos compiten por los sitios de unión al anticuerpo en un formato ELISA competitivo. El ensayo para la salvinorina A, sus análogos y metabolitos puede ser un ensayo de un solo analito, tal como una tira reactiva o el formato ELISA basado en microtitulación o puede ser parte de un ensayo de múltiples analitos, en el que un sustrato adecuado, tal como un biochip soporta varios anticuerpos específicos de analitos, usando los diversos analitos detectados y medidos un sistema analizador adecuado, tal como Evidence™ o Evidence o Investigator™.

Con el fin de generar antisueros policlonales, el inmunógeno de la presente invención se mezcla con adyuvante de Freund y la mezcla se inyecta en un animal hospedante, preferiblemente un animal vertebrado, más preferiblemente un animal mamífero, tal como conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. Se administran inyecciones adicionales (refuerzos) y se toman muestras del suero para la evaluación del título de anticuerpos. Cuando se ha alcanzado el título óptimo, el animal hospedante se sangra para obtener un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de anticuerpo requerido depende de la aplicación prevista. Para muchos fines, no hay ningún requisito para la purificación, sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo es para ser inmovilizado sobre un soporte sólido, se deben realizar etapas de purificación para retirar el material no deseado y eliminar la unión no específica. Preferiblemente, los anticuerpos son policlonales. Alternativamente, los anticuerpos son monoclonales.

La invención se describirá ahora por medio de los métodos generales y ejemplos específicos.

Métodos generales y ejemplos

Métodos generales

La formación de inmunógenos implica la química de conjugación convencional en la que el oxígeno del grupo hidroxilo de un hapteno se combina en primer lugar con DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) y luego con NHS (N-hidroxisuccinimida) formando un éster con un potente grupo lábil. El ataque nucleofílico sobre el carbonilo de la funcionalidad éster por un grupo amino libre en la proteína (BSA o BTG) da como resultado un enlace amídico y la formación de los inmunógenos diana. La formación del conjugado hapteno-HRP sigue un mecanismo similar utilizando EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y sulfo-NHS. Para el acoplamiento de agentes reticulantes a haptenos y a los accm, y haptenos a agentes marcadores para formar conjugados, el lector experto debe consultar *Bioconjugate Techniques* G. Hermanson, ed., Academic Press, 1996, pp. 785, cuyo contenido se incorpora en su totalidad.

Con el fin de confirmar que tipo de conjugación adecuada de hapteno al material portador se ha conseguido, antes de la inmunización, se evalúa cada inmunógeno utilizando espectroscopía de masas en la que la ionización se efectúa mediante desorción por láser UV asistida por matriz y los iones se detectan mediante un sistema de "tiempo de vuelo" (MALDI-TOF MS). La MALDI-TOF MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas mediante desorción por láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Una parte alícuota de cada muestra que se iba a analizar se diluyó en ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1% para crear soluciones de muestra de 1 mg/ml. Se analizaron partes alícuotas (1 µL) utilizando una matriz de ácido sinapínico y se usó seroalbúmina bovina (Fluka) como calibrador externo.

Ejemplo 1: Extracción de salvinorina A de *Salvia divinorum*

Se trituraron hojas de *Salvia divinorum* desecadas (0,5 kg) hasta obtener un polvo fino y se trataron con acetona (5 x 1,5 L). El extracto de acetona se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida proporcionando una goma verde en bruto, que se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando hexano/acetato de etilo (90%/10%) como fase móvil obteniéndose una mezcla de salvinorina A, salvinorina B y otros productos minoritarios. Este producto verde en bruto obtenido se recrystalizó en isopropanol dando salvinorina A (2,2 g).

Punto de fusión (P.f.): 231-236°C; ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ 202,5, 172,1, 171,5, 169,5, 144,4, 140,6, 126, 109,2, 73,3, 71,4, 61,6, 52,1, 52, 49,9, 42,7, 41,8, 37,6, 35,2, 30,7, 20,8, 18,2, 16,3, 15,1; TLC: R_f = 0,32 (EtOAc:hexano, 50:50)

Ejemplo 2: Preparación de salvinorina B

A una disolución de salvinorina A (500 mg, 1,15 mM) en metanol (10 mL) se añadió carbonato de sodio sólido (490 mg, 4,6 mM) y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. Se añadió agua (20 mL) a la mezcla y la mezcla se agitó durante 30 minutos. La disolución se filtró y la torta de filtración se lavó con agua enfriada con hielo (20 mL) y metanol enfriado con hielo (20 mL) y se secó en un desecador dando salvinorina B (191 mg, 42%).

P.f.: 241-248°C; ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ 209,3, 172,2, 171,4, 144,2, 139,8, 125,7, 108,7, 74,8, 72,3, 64,2, 53,6, 52,3, 51,8, 44, 43, 38,5, 35,8, 35, 18,6, 16,5, 15,7; TLC: R_f = 0,21 (EtOAc:hexano, 50:50)

Ejemplo 3: Preparación de salvinorina-hemisuccinato (Hapteno A - Figura 1)

A salvinorina B (190 mg, 0,487 mmol) y anhídrido succínico (112 mg, 2,5 eq) en suspensión en diclorometano (5 mL) a 0°C se añadió gota a gota DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno) (218 µL, 3 eq). La mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos, se lavó con ácido cítrico al 3% (5 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (5 mL) y salmuera (5 mL). La mezcla se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice: CH₂Cl₂ a MeOH al 5% en CH₂Cl₂) dando salvinorina-hemisuccinato (130 mg, 54%).

Ejemplo 4: Conjugación de hapteno A con BSA

Se conjugó hapteno A con seroalbúmina bovina (BSA) por medio de EDC/NHS de acuerdo con procedimientos estándares. Se disolvió hidrocloreuro de EDC (105 mg) en agua (0,5 mL) y se añadió inmediatamente a una disolución de hapteno A (73,6 mg, 0,15 mmol) en DMF (1 mL). Después de la mezcla, se añadió esta disolución a una disolución de BSA (200 mg) en agua (10 mL). Se añadió inmediatamente N-hidroxisuccinimida (NHS) (22,5 mg) y la mezcla de reacción se incubó y se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. A continuación se dializó la mezcla frente a tampón de fosfato 50 mM, pH 7,2, (3 cambios) durante 24 horas y se liofilizó. Los resultados de MALDI mostraron una relación molecular de hapteno A:BSA de aproximadamente 17:1.

Ejemplo 5: Conjugación de hapteno A con BTG (Inmunógeno - Figura 2)

Se disolvió hidrocloreuro de EDC (95 mg) en agua (0,5 mL) y se añadió inmediatamente a una disolución de hapteno A (66,2 mg, 0,14 mmol) en DMF (1 mL). Después de la mezcla, se añadió esta disolución a una disolución de BTG (150 mg) en agua (10 mL). Se añadió inmediatamente N-hidroxisuccinimida (NHS) (25 mg) y la mezcla de reacción se incubó y se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. A continuación se dializó la mezcla frente a tampón de fosfato 50 mM, pH 7,2, (3 cambios) durante 24 horas y se liofilizó.

Ejemplo 6: Síntesis de hapteno B (Figura 2)

Se añadió yoduro de litio (1,52 g, 11,4 mmol) a una disolución de salvinorina A (1 g, 2,3 mmol) en piridina anhidra (20 mL). La mezcla de reacción se protegió de la luz con papel de aluminio y se calentó a reflujo durante 36 horas. La mezcla se evaporó hasta sequedad a vacío y el residuo se trató con agua enfriada con hielo y se acidificó a pH 4 a 5 utilizando HCl 1 M seguido por extracción con acetato de etilo (3 x 100 mL). Las capas orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice: EtOAc al 50% en hexano a EtOAc al 100%) dando hapteno B (140 mg) y hapteno C (151 mg). TLC: hapteno B, R_f = 0,28 (acetato de etilo)

Ejemplo 7: Conjugación de hapteno B con BSA

Se disolvió hidrocloreuro de EDC (90 mg) en agua (0,5 mL) y se añadió inmediatamente a una disolución de hapteno B (41,3 mg, 0,098 mmol) en DMF (1 mL). Después de la mezcla, se añadió esta disolución a una disolución de BSA (150 mg) en agua (10 mL). Se añadió inmediatamente N-hidroxisuccinimida (NHS) (20 mg) y la mezcla de reacción se incubó y se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. A continuación se dializó la mezcla frente a tampón de fosfato 50 mM, pH 7,2, (3 cambios) durante 24 horas y se liofilizó. Los resultados de MALDI mostraron una relación molecular de hapteno B:BSA de aproximadamente 4,3:1

Ejemplo 8: Conjugación del hapteno A con HRP (Conjugado I)

Se disolvió EDC.HCl (1,5 mg) en agua (0,5 mL) y se añadió inmediatamente a una disolución de hapteno A (3 mg) en DMF (0,3 mL). Después de mezclar durante 2 horas, la disolución se añadió gota a gota a una disolución de HRP (20 mg) en disolución salina tamponada con fosfato (1,8 mL, pH 8). La mezcla se incubó en la oscuridad durante una noche a la temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de hapteno por desalación con columnas PD-10 (Pharmacia) en serie, pre-equilibradas con PBS (disolución salina tamponada con fosfato) a pH 7,2. El conjugado hapteno-HRP se dializó durante una noche frente a 10 L de PBS (pH 7,2) a 4°C, se filtró y se conservó a -20°C.

Ejemplo 9: Desarrollo de ensayos ELISA para salvinorina A y salvinorina B

Se administró mensualmente inmunógeno la a ovejas adultas para proporcionar antisueros policlonales específicos de dianas. Se extrajo IgG de los antisueros por precipitación de inmunoglobulina con ácido caprílico/sulfato de amonio. Se recubrieron placas de microtitulación (Thermo Scientific, 95029180) con anticuerpo (125 µL en un tampón de revestimiento Tris 10 mM, pH 8,5) a 37°C durante 2 horas. El anticuerpo se revistió a 2,5 µg/mL. A continuación se lavaron las placas. Se añadieron 50 µL de muestra y el calibrador (salvinorina A y salvinorina B preparadas en Randox Laboratories) a los pocillos apropiados por triplicado, seguido de 75 µL de Conjugado I (en 1/128k) y se incubaron a 25°C durante 1 hora. A continuación se lavaron las placas y se añadieron a cada pocillo 125 µL de TMB y se dejaron a la temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo usando 125 µL de ácido sulfúrico 0,2 M. A continuación se leyeron las absorbancias a 450 nm con un lector ELISA Microplate (BIO-TEK Instruments, EL340) y se calcularon los valores medios. A continuación, se determinaron la sensibilidad y especificidad del anticuerpo.

ES 2 415 733 T3

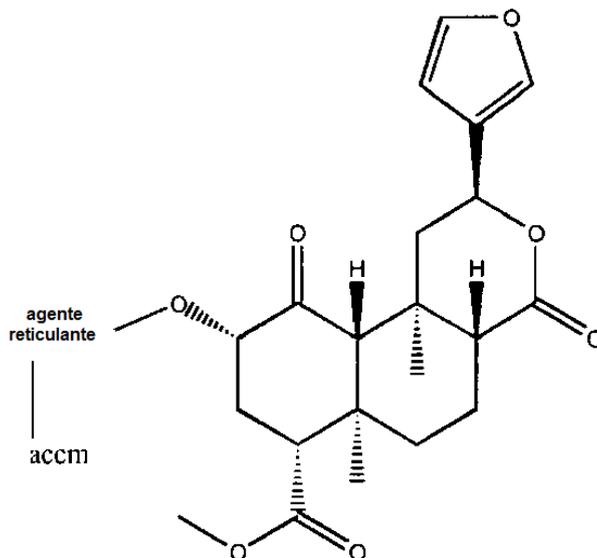
La Tabla 1 muestra que el ensayo reconoce tanto la salvinorina A como la salvinorina B con una Cl_{50} usando 0,277 ng/mL y 2,909 ng/mL de conjugado I, respectivamente. La sensibilidad analítica (SA) del ensayo de salvinorina A es 0,013 ng/mL, más de 100 veces más sensible que los ensayos existentes.

5 **Tabla 1:** Datos generados por ensayo competitivo en placa de microtitulación de salvinorina A y salvinorina B empleando antisueros generados para el inmunógeno I (hapteno A-BTG)

Concentración del calibrador (ng/mL)	Conjugado I				Conjugado II			
	Salvinorina A		Salvinorina B		Salvinorina A		Salvinorina B	
	A_{450}	% B/ B_0						
0	2,032	100	2,026	100	2,410	100	2,347	100
0,16	1,255	62	1,700	84	1,540	64	1,993	85
0,31	0,970	48	1,502	74	1,221	51	1,837	78
0,63	0,724	36	1,428	70	0,947	39	1,675	71
1,25	0,520	26	1,275	63	0,716	30	1,433	61
2,50	0,373	18	1,020	50	0,481	20	1,189	51
5,00	0,272	13	0,867	43	0,333	14	1,005	43
10,00	0,180	9	0,677	33	0,217	9	0,779	33
Cl_{50}	0,277 ng/mL		2,909		0,331		2,758	
% de RC	100		9,52		100		12,00	
SA	0,013 ng/mL							
SF	0,045 ng/mL							
<p>A_{450} = absorbancia a 450 nm, B = absorbancia a 450 nm a una concentración del calibrador de x ng/mL; B_0 = absorbancia a 450 nm a una concentración del calibrador de 0 ng/mL; Cl_{50} = concentración estándar que produce 50% de B/B_0; % de RC = porcentaje de reactividad cruzada basado en una especificidad del 100% para salvinorina A, SA = sensibilidad analítica (concentración del calibrador en A_{450} de patrón cero menos 2 desviaciones típicas, de 20 repeticiones); SF = sensibilidad funcional (la menor concentración del calibrador que se puede medir con un coeficiente de variación entre ensayos <20%, de 20 repeticiones)</p>								

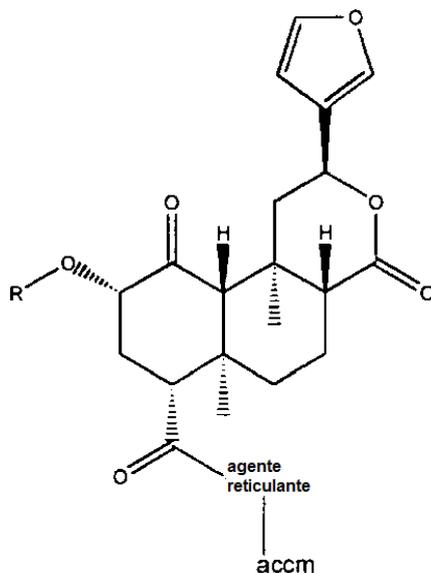
REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar o determinar salvinorina A, salvinorina B y análogos en C-9 de salvinorina A y salvinorina B en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un conjugado y un anticuerpo, detectar el conjugado unido y deducir a partir de una curva de calibración la presencia, o la cantidad, de salvinorina A, salvinorina B y análogos en C-9 de salvinorina A, en donde el anticuerpo se produce contra un inmunógeno de la siguiente estructura



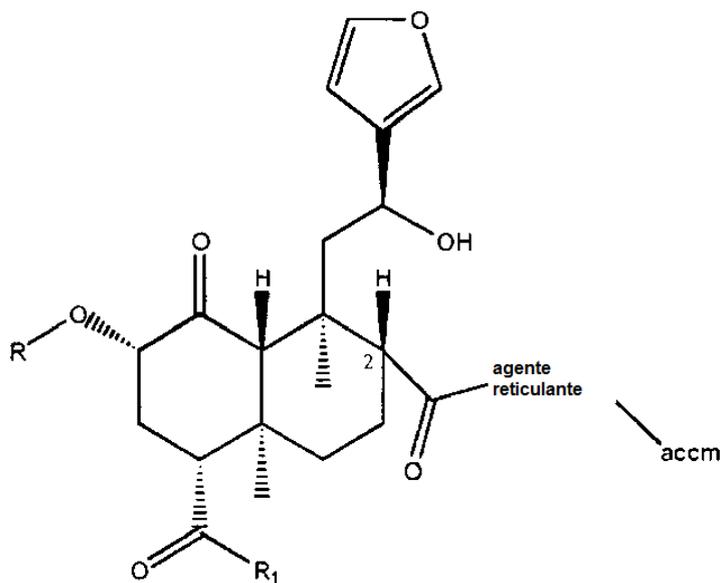
en donde accm es un material portador que confiere antigenicidad y el agente reticulante une el átomo de O en C-9 del anillo tricíclico fusionado al accm.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se produce contra un inmunógeno en el que el agente reticulante es $-(X)_n-Y-Z-$, en donde $n = 0$ o 1 , y si X está presente es preferiblemente carbonilo, tiocarbonilo, oxicarbonilo u oxitiocarbonilo; Y es preferiblemente un resto alquileo saturado o de cadena lineal sustituida o no sustituida de C_{1-10} , más preferiblemente de C_{2-6} , o un resto arileno; Z es preferiblemente un grupo carbonilo o un grupo amino.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el análogo en C-9 es 9-metoximetiléter-salvinorina B o 9-etoximetiléter-salvinorina B.
4. Un método para detectar o determinar salvinorina A y/o salvinorina B y análogos en C-7 de salvinorina A y/o salvinorina B en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un conjugado y con al menos un anticuerpo, detectar el conjugado unido y deducir a partir de una curva de calibración la presencia, o la cantidad, de salvinorina A y/o salvinorina B y análogos en C-7 de salvinorina A y/o salvinorina B, en donde el anticuerpo se produce contra un inmunógeno de la siguiente estructura



en donde R = H o acetilo, accm es un material portador que confiere antigenicidad y el agente reticulante une el grupo carbonilo en C-7 del anillo tricíclico fusionado al accm.

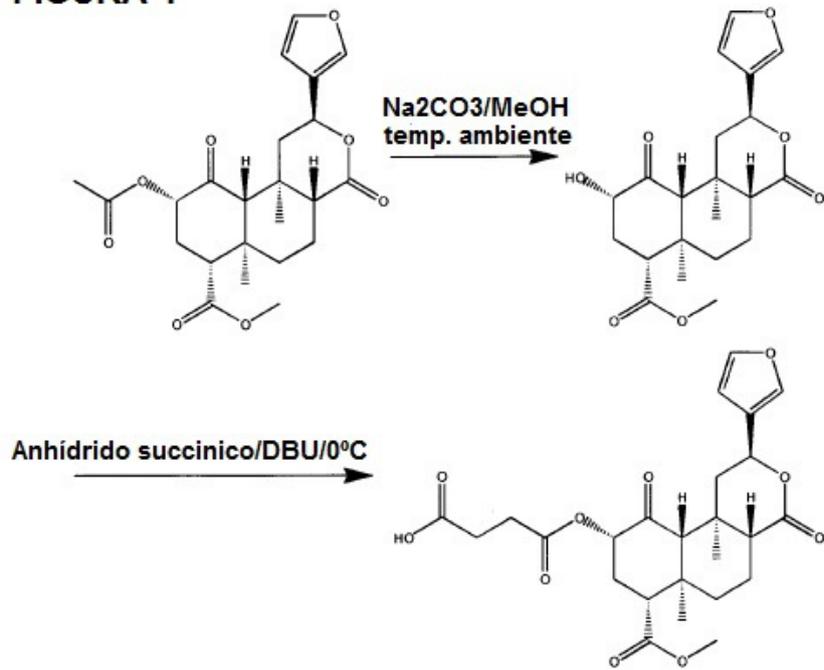
- 5 5. El método de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo se produce contra un inmunógeno en el que R del inmunógeno es H o acetilo; el agente reticulante es $-(X)_n-Y-Z-$, donde $n = 0$ o 1 , y si X está presente es preferiblemente un heteroátomo seleccionado de O, S y N que se une al grupo carbonilo unido en C-7 del anillo tricíclico condensado; Y es preferiblemente un resto alquileo saturado o de cadena lineal sustituida o no sustituida de C_{1-10} , más preferiblemente de C_{2-6} , o un resto arileno; Z es preferiblemente un grupo carbonilo o un grupo amino.
- 10 6. Un método para detectar o determinar ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-5-metoxicarbonil-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico, ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-5-carboxi-7-hidroxi-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico, ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-5-carboxi-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico o ácido 2-((1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a-dimetil-1-[(S)-2-(3-furanil)-2-hidroxi-5-metoxicarbonil-8-oxodecahidronaft-2-il]etanoico en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en
- 15 contacto la muestra con un conjugado y con al menos un anticuerpo, en donde el anticuerpo se produce contra un inmunógeno de la siguiente estructura



en donde R = H o acetilo y R₁ = OH o CH₃-O-, accm es un material portador que confiere antigenicidad y el agente reticulante une el grupo carbonilo en C-2 del anillo bicíclico fusionado al accm.

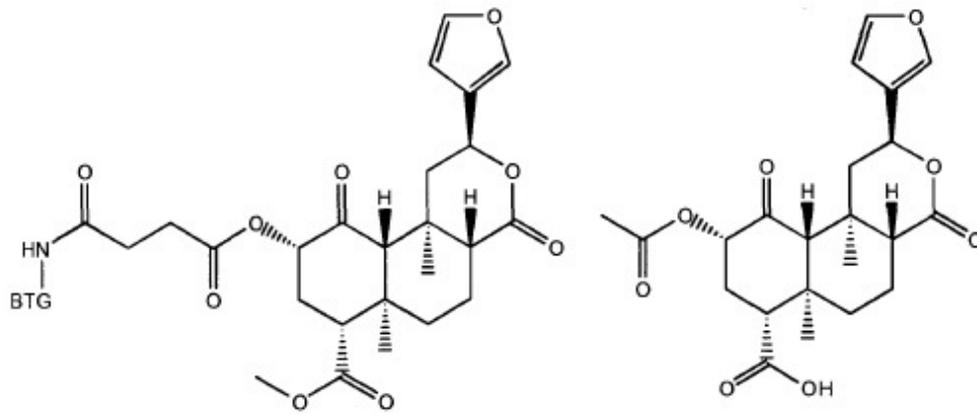
- 5 7. El método de la reivindicación 6, donde el anticuerpo se produce contra un inmunógeno en el que R del inmunógeno es H o acetilo y R₁ del inmunógeno es OH o CH₃-O-; el agente reticulante es -(X)_n-Y-Z-, donde n es 0 o 1 y si X está presente es preferiblemente N, O o S; Y es preferiblemente un resto alquileo saturado o de cadena lineal sustituida o no sustituida de C₁₋₁₀, más preferiblemente de C₁₋₆, o un resto arileno; Z del inmunógeno es preferiblemente un grupo carbonilo o un grupo amino.
- 10 8. Un anticuerpo producido contra un inmunógeno como se describe en las reivindicaciones 1 o 2, siendo el anticuerpo capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinorina A, salvinorina B y análogos en C-9 de salvinorina A y salvinorina B.
9. Un anticuerpo producido contra un inmunógeno como se describe en la reivindicación 3, siendo el anticuerpo capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinorina A, salvinorina B, 9-metoximetiléter-salvinorina B y 9-etoximetiléter-salvinorina B.
- 15 10. Un anticuerpo producido contra un inmunógeno como se describe en las reivindicaciones 4 o 5, siendo el anticuerpo capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de salvinorina A y análogos en C-7 de salvinorina A.
- 20 11. Un anticuerpo producido contra un inmunógeno como se describe en las reivindicaciones 6 o 7, siendo el anticuerpo capaz de unirse con al menos un epítipo estructural de ácido 2- $\{(1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a\text{-dimetil-1-}[(S)\text{-}2\text{-}(3\text{-furanil})\text{-}2\text{-hidroxietil}]\text{-}7\text{-hidroxi-}5\text{-metoxicarbonil-}8\text{-oxodecahidronaft-}2\text{-il}\}\text{etanoico}$, ácido 2- $\{(1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a\text{-dimetil-1-}[(S)\text{-}2\text{-}(3\text{-furanil})\text{-}2\text{-hidroxietil}]\text{-}5\text{-carboxi-}7\text{-hidroxi-}8\text{-oxodecahidronaft-}2\text{-il}\}\text{etanoico}$, ácido 2- $\{(1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a\text{-dimetil-1-}[(S)\text{-}2\text{-}(3\text{-furanil})\text{-}2\text{-hidroxietil}]\text{-}7\text{-acetoxi-}5\text{-carboxi-}8\text{-oxodecahidronaft-}2\text{-il}\}\text{etanoico}$ o ácido 2- $\{(1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a\text{-dimetil-1-}[(S)\text{-}2\text{-}(3\text{-furanil})\text{-}2\text{-hidroxietil}]\text{-}7\text{-acetoxi-}5\text{-metoxicarbonil-}8\text{-oxodecahidronaft-}2\text{-il}\}\text{etanoico}$.
- 25 12. Un kit para detectar o determinar salvinorina A, salvinorina B y análogos en C-9 de salvinorina A y salvinorina B, incluyendo el kit al menos un anticuerpo de la reivindicación 8.
13. Un kit para detectar o determinar salvinorina A, salvinorina B, 9-metoximetiléter-salvinorina B y 9-etoximetiléter-salvinorina B, incluyendo el kit al menos un anticuerpo de la reivindicación 9.
14. Un kit para detectar o determinar salvinorina A y análogos en C-7 de salvinorina A, incluyendo el kit al menos un anticuerpo de la reivindicación 10.
- 30 15. Un kit para detectar o determinar ácido 2- $\{(1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4\text{-a-dimetil-1-}[(S)\text{-}2\text{-}(3\text{-furanil})\text{-}2\text{-hidroxietil}]\text{-}7\text{-hidroxi-}5\text{-metoxicarbonil-}8\text{-oxodecahidronaft-}2\text{-il}\}\text{etanoico}$, ácido 2- $\{(1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a\text{-dimetil-1-}[(S)\text{-}2\text{-}(3\text{-furanil})\text{-}2\text{-hidroxietil}]\text{-}5\text{-carboxi-}7\text{-hidroxi-}8\text{-oxodecahidronaft-}2\text{-il}\}\text{etanoico}$, ácido 2- $\{(1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a\text{-dimetil-1-}[(S)\text{-}2\text{-}(3\text{-furanil})\text{-}2\text{-hidroxietil}]\text{-}7\text{-acetoxi-}5\text{-carboxi-}8\text{-oxodecahidronaft-}2\text{-il}\}\text{etanoico}$ o ácido 2- $\{(1R,2R,4aR,5R,7S,8aR)-1,4a\text{-dimetil-1-}[(S)\text{-}2\text{-}(3\text{-furanil})\text{-}2\text{-hidroxietil}]\text{-}7\text{-acetoxi-}5\text{-metoxicarbonil-}8\text{-oxodecahidronaft-}2\text{-il}\}\text{etanoico}$, incluyendo el kit al menos un anticuerpo de la reivindicación 11.
- 35

FIGURA 1



Síntesis de Salvinorina A-7-hemisuccinato (Hapteno A)

FIGURA 2



Immunógeno Ia (izquierda) y Hapteno B (derecha)