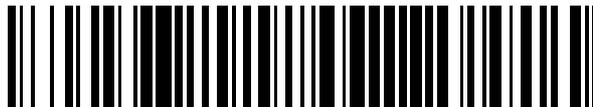


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 817**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/44** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2011 E 11169178 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2402762**

54 Título: **Inmunoanálisis de hidrato de cloral**

30 Prioridad:

**30.06.2010 EP 10168015**

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

**08.10.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BENCHIKH, ELOUARD;  
FITZGERALD, PETER;  
LOWRY, PHILIP y  
MCCONNELL, IVAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 424 817 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

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La detección y cuantificación analítica de drogas psicoactivas, drogas terapéuticas, residuos de fármacos veterinarios y contaminantes ambientales, tales como pesticidas y sustancias químicas industriales, constituyen una práctica comercial importante y generalizada, y se puede llevar a cabo en el laboratorio o sobre el terreno. El equipo analítico utilizado en el laboratorio y en el terreno puede ser el mismo, pero los métodos en el terreno están generalmente más limitados debido al tamaño y a la capacidad de análisis. Por ejemplo, a pesar de que se han elaborado formatos portátiles, los métodos analíticos más  
10 comúnmente utilizados para una cuantificación precisa son la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía líquida (CL), a menudo vinculadas a los espectrómetros de masas (lo que da GC-MS y LC-MS por sus siglas en inglés, respectivamente) y su utilización se restringe a un entorno de laboratorio. Las principales alternativas a los métodos cromatográficos se basan en la interacción de moléculas a través de reacciones químicas o de formación de complejos químicos, estando esta última caracterizada por la unión del anticuerpo-ligando. Las principales ventajas de estos métodos químicos  
15 "vinculantes", en comparación con los métodos cromatográficos, son su relativo bajo coste y su sencillez y portabilidad, lo que permite su utilización sobre el terreno.

El hidrato de cloral 2,2,2-tricloroetanol se utiliza como sedante en el proceso de anestesia y como precursor químico en química orgánica sintética. Su utilización para combatir el insomnio puede  
20 conducir a la adicción y a la sobredosis (Gaulhier y col. 2001; Engelhart y col. 1998). La sobredosis de hidrato de cloral se detecta a menudo mediante la reacción de Fujiwara, que detecta el metabolito 2,2,2-tricloroetanol, seguido por la cuantificación mediante GC-MS. Sus propiedades sedantes han sido explotadas para su uso ilegal: esta sustancia, mezclada con alcohol, produce las famosas "gotas noqueadoras" o "Mickey Finn", insípidas e inodoras e históricamente conocidas por su utilización para cometer robos con mayor facilidad. En cualquier debate o análisis sobre la violación por sumisión  
25 química (DFR, por sus siglas en inglés) por lo general se menciona el hidrato de cloral. Sin embargo, la prueba definitiva de su uso en la DFR es por lo general poco eficiente, lo que implica o bien que dicho uso es poco frecuente, o que existen problemas para detectar esta sustancia. El hidrato de cloral se metaboliza rápidamente (Breimer 1974) y los principales metabolitos son tricloroetanol, tricloroetanol glucurónico (TGC) y ácido tricloroacético, con sus respectivas vidas medias de 7-10 horas, 7-10 horas y  
30 aproximadamente 4 días (PharmGKB: The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base, Chloral Hydrate, Accession ID:PA448925). En las veinticuatro horas posteriores a la administración de una dosis vía oral única de hidrato de cloral, aproximadamente el 0,7 % se excreta en la orina como tricloroetanol y el 28 % como TGC. (Eliminación de drogas y sustancias químicas tóxicas en el hombre, octava edición [original inglés: *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, eighth edition*]). Los

métodos analíticos para detectar y cuantificar los metabolitos de hidrato de cloral incluyen una CG equipada con un detector ECD (Breimer 1977; Ikedo y col. 1984) y la reacción Fujiwara más CG-EM (Heller y col. 1992).

5 El hidrato de cloral es un producto derivado de los productos de desinfección (DBP por sus siglas en inglés) que se utilizan en la cloración industrial del agua, atribuido a la reacción del cloro con la materia orgánica traza como el ácido húmico, y ha sido clasificado como un posible carcinógeno humano por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA) y Health Canada. La EPA de EE. UU. ha aprobado un método que utiliza cromatografía de gases y detección de captura de electrones (CG-DCE) para su  
10 cuantificación y Health Canada sugiere una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,3 mg al día para una persona común (Health Canada, Orientación sobre hidrato de cloral en el agua potable). Los niveles en el agua potable se han calculado en una cifra que oscila entre 1,2 y 8,4 ng/ml (máximo 23 ng/ml) en Canadá y entre 1,7 y 2,5 ng/ml (máximo 46 ng/ml) en Estados Unidos. El tricloroetileno es un disolvente industrial muy utilizado en la limpieza y el desengrasado del metal y la exposición humana a esta sustancia química puede producirse a través del aire contaminado, el agua potable o los alimentos. Tras  
15 su inhalación o ingestión, la sustancia química se metaboliza rápidamente a través de dos rutas: la conjugación con glutatión, que es la ruta menor, y la oxidación por las enzimas del citocromo P450, que es la ruta principal. La ruta principal de oxidación produce el epóxido, que se transforma rápidamente en hidrato de cloral o cloral, seguido por la síntesis de tricloroetanol, y, finalmente, la formación de glucurónido tricloroetanol (L.H. Lash y col. 2000). El glucurónido se encuentra en la orina de los seres humanos u otros mamíferos que se han visto expuestos al tricloroetileno, o a los que se les ha  
20 administrado tricloroetileno (Lash y col. 2000 20; Stenner y col. 1997, Kim y Ghanayem 2006) y se ha relacionado con las enfermedades autoinmunes.

Por lo tanto, la disposición de un ensayo que se base en anticuerpos para estudiar un caso de violación en la que se ha utilizado hidrato de cloral, un exceso de cloro en el agua y la sospecha de exposición al tricloroetileno, constituirían una alternativa rápida y barata frente a los métodos actuales para detectar la  
25 sustancia. Por otra parte, un dispositivo listo para utilizar, como una varilla de medición, permitiría a las personas o agencias de vigilancia del medio ambiente detectar el hidrato de cloral, cloro y tricloroetileno de forma indirecta mediante la medición de TCG en muestras de orina. En la actualidad no existen inmunoanálisis conocidos para el hidrato de cloral o sus metabolitos, tricloroetanol, glucurónido tricloroetanol y ácido tricloroacético.

**Bibliografía**

- Breimer D.D. (1977). *Clin. Pharmacokin.*, 2: 93-109
- Engelhart D.A. y col. (1998) *J. Anal. Toxicol.*, 22: 246-247
- Gaullier J.M. y col. (2001). *J. Forensic Sci.*, 46: 1507-1509
- Heller P. y col. (1992). *Forens. Sci. Int.*, 52:231-234
- Lash y col. 1984). *J. Chromatogr.*, 307: 111-119
- Lash y col. 2000) *Env. Health Perspectives*, 108: 177-200
- Stenner et al (1997). *Drug Metab. Dispos.*, 25: 529-535;
- Kim D. y Ghanayem B. (2006). *Drug Metab. Dispos.*, 34: 2020-2027

**COMPENDIO DE LA INVENCION**

El presente documento describe el primer inmunoanálisis conocido que confirma de forma indirecta la presencia o el uso de hidrato de cloral. Debido al rápido metabolismo del hidrato de cloral, los inventores desarrollaron, mediante nuevos inmunógenos y un nuevo anticuerpo, un inmunoanálisis sustituto para su detección y cuantificación que se enfoca en el metabolito TCG. El anticuerpo de la invención es sorprendentemente específico para TCG. El uso de un anticuerpo específico TCG en un contexto de un inmunoanálisis resuelve las limitaciones de recursos y prácticas asociadas a los métodos analíticos descritos anteriormente y que se utilizan para detectar el hidrato de cloral y sus metabolitos, lo que permite su aplicación en diversas áreas como la DFR, análisis del agua y toxicología ambiental.

**DIBUJOS**

**Ilustración 1** Preparación de Hapteno A

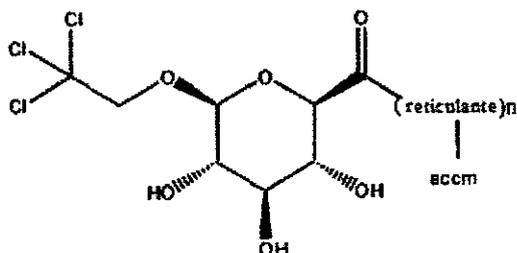
**Ilustración 2** Preparación de Hapteno B

**Ilustración 3** Antígeno II

**Ilustración 4** Hidrato de cloral y metabolitos

**EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Un primer aspecto de la invención es un antígeno de la estructura (estructura 1)



Estructura 1

donde  $n = 0$  o  $1$ . Donde  $n = 1$ , el agente de reticulación se une al carbonilo sustituyente del anillo de tetrahidropirano al accm (siglas en inglés), un material transportador que confiere antigenicidad. El agente de reticulación es un grupo que une el hapteno al accm. El hapteno de la presente invención es la fracción de triclorometilpirano de la Estructura 1 que está unida bien al reticulante o al accm. El agente de reticulación, es preferiblemente -X-Y-Z-, donde X es un heteroátomo, preferiblemente nitrógeno, oxígeno o azufre; Y es un C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, preferiblemente un C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, fracción de cadena lineal de alquileo, o fracción de alquileo; Z (antes de la conjugación con el accm) se selecciona de un carboxi, un ditiopiridilo, una maleimida, un amino, un hidroxilo, un tiol, un tioéster o una fracción de aldehído, más preferiblemente una fracción de carboxi. Un antígeno preferido es donde  $n = 0$ , es decir un antígeno en el que el TCG está unido directamente al accm. Un antígeno preferido de la invención es el Antígeno II (Ejemplo 5).

Un segundo aspecto de la invención es un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de TCG para su uso en la detección de TCG en una muestra *in vitro* tomada de un paciente. El anticuerpo es producido contra un antígeno de la estructura 1. Según lo comprendería un experto en la materia, implica específicamente que el anticuerpo de la invención se una al TCG y no a las moléculas compuestas de subestructuras moleculares del TCG, como por ejemplo el glucurónido de etilo que contiene el anillo de azúcar de TCG o tricloroacético ácido que contiene la fracción de triclorometilo del TCG.

El accm puede ser cualquier material que convierta la molécula hapteno-accm en antígeno. Por ejemplo, el accm puede ser una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido

semisintético. El anticuerpo puede ser monoclonal, pero es preferible que sea policlonal. Otro aspecto de la invención es el método para confirmar que una persona ha ingerido hidrato de cloral.

5 El método consiste en poner en contacto una muestra *in vitro* tomada de dicha persona y un conjugado (como TCG-HRP - véase el Ejemplo 6), y un anticuerpo que se une a un epítipo de TCG, detectando el conjugado unido y deduciendo por comparación con un valor de corte adecuado la presencia o ausencia de hidrato de cloral.

10 Otro aspecto de la invención es un método para detectar y cuantificar el TCG en una persona, el método consiste en poner en contacto una muestra *in vitro* tomada de la persona con un conjugado, y el anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 3 o 4, detectando el conjugado unido y deduciendo a partir de los valores del calibrador la presencia o cantidad de TCG. La cuantificación exacta de TCG, a diferencia del método semicuantitativo que utiliza un valor de corte, permite, teniendo en cuenta el tiempo aproximado de ingestión, estimar la cantidad de hidrato de cloral ingerida. Esto se consigue utilizando el valor medio de vida del hidrato de cloral y la proporción de TCG e hidrato de cloral.

15 La muestra puede ser de cualquier fluido biológico periférico, pero es preferible que sea plasma, suero u orina, más preferiblemente orina. Los conjugados del método se componen de haptenos unidos a agentes de marcaje. Los haptenos de los conjugados son moléculas que pueden fijarse a los anticuerpos del método. La capacidad del conjugado para fijarse al anticuerpo de la invención le permite desplazar el TCG, que es la base de la inmunoanálisis competitivo; también se pueden aplicar otros formatos de inmunoanálisis, tales como el método indirecto. El uso de conjugados de haptenos, conjugados y anticuerpos en el contexto de los inmunoanálisis es bien conocido en esta materia. Es preferible que el agente de marcaje de los conjugados se seleccione a partir de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva o una mezcla de las mismas. Es preferible que el agente de marcaje sea una enzima, más preferible un peroxidasa y aun más preferible una peroxidasa del rábano (HRP, por sus siglas en inglés). De forma alternativa o adicional, la sustancia luminiscente puede ser un material  
20 bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente.  
25

También se describe un kit para detectar la presencia o el uso de hidrato de cloral en una persona, el uso de productos de cloración en el agua potable y la exposición a tricloroetileno de las personas. El kit

incluye el anticuerpo que se fija a un epítopo del TCG y un conjugado. Otra opción es que el kit incluya instrucciones para utilizar dichos anticuerpos en la detección de TCG. Es preferible que el conjugado sea un derivado de TCG como TCG-HRP. Por otra parte, el agua potable se puede someter a un análisis de hidrato de cloral de forma directa, que consiste en la formación y detección midiendo el TCG *in situ*. Este proceso implicaría tomar una muestra de agua potable (la solución) y sintetizar el TCG *in situ*, ya sea de forma enzimática (utilizando una uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasa) o por medio de la derivatización química.

Otro aspecto de la invención es un kit para detectar y cuantificar el TCG. Dicho kit incluye un anticuerpo que se fija a un epítopo de TCG y un conjugado. Es preferible que el conjugado sea un derivado de TCG como TCG-HRP. Otra posibilidad es que el kit incluya instrucciones para utilizar dichos anticuerpos en la detección de TCG. El kit puede incluir además calibradores.

#### **Métodos generales y Resultados**

##### Preparación de haptenos, antígenos y conjugados

Aunque los haptenos proporcionan epítopos estructurales definidos, no son en sí mismos inmunógenos y, por lo tanto, necesitan ser conjugados con materiales portadores, lo que provocará una respuesta inmunógena cuando se administra a un animal receptor. Los materiales portadores pertinentes contienen por lo general segmentos de poli(aminoácidos) e incluyen polipéptidos, proteínas y glicoproteínas. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, la tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KLH), etcétera. Alternativamente, se pueden emplear sintéticos de poli(aminoácidos) con un número suficiente de grupos de amino disponibles como la lisina, puesto que otros materiales poliméricos naturales o sintéticos pueden incluir grupos funcionales reactivos. En particular, carbohidratos, levaduras o polisacáridos pueden conjugarse con el hapteno para producir un inmunógeno. Los haptenos también se pueden acoplar a un agente de marcaje detectable como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano), una sustancia con propiedades fluorescentes o una etiqueta radioactiva para la preparación de conjugados (o reactivos de detección) para su uso en los inmunoanálisis. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado del mismo. La formación del inmunógeno implica métodos de conjugación convencionales. Por ejemplo, el oxígeno del grupo hidroxilo del grupo ácido carboxílico de TCG combina primero con DCC y luego NHS para formar un

éster activado con un grupo de salida potente. El ataque nucleófilo sobre el carbonilo del éster activado por un grupo amino de la proteína (BSA o BTG) da como resultado un enlace amida y la formación del inmunógeno. Con el fin de confirmar que se ha conseguido la conjugación adecuada del hapteno con el material portador, antes de la inmunización, cada antígeno se evalúa utilizando la técnica de espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS por sus siglas en inglés).

#### Procedimiento para el análisis de inmunógenos por MALDI-TOF

La espectrometría MALDI-TOF MS se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas de desorción láserica Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Una porción alícuota de cada una de las muestras objeto de análisis se diluyó en una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% para crear soluciones de muestra de 1 mg/ml. Estas porciones alícuotas (1 µl) se analizaron utilizando una matriz de ácido sinapínico y la albúmina de suero bovino (Fluka) se usó como un calibrador externo.

#### Preparación de antisueros

Con el fin de generar antisuero policlonal, el antígeno de la presente invención se mezcla con adyuvante de Freund y la mezcla se inyecta en un animal receptor, que es preferible que sea un animal vertebrado y más preferiblemente un mamífero, como un conejo, una oveja, un ratón, una cobaya o un caballo. Se elaboran las inyecciones adicionales (refuerzos) y se obtiene una muestra del suero para la evaluación del título de anticuerpos. Cuando el título óptimo se ha alcanzado, se extrae sangre del animal receptor para producir un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de anticuerpos requerido depende de la aplicación prevista. En muchos casos no se requiere una purificación; sin embargo, en otros casos, como cuando el anticuerpo tiene que ser inmovilizado sobre un soporte sólido, se pueden aplicar las etapas de purificación para deshacerse del material no deseado y eliminar la unión no específica.

#### Desarrollo del inmunoanálisis

El proceso de desarrollo de un inmunoanálisis es bien conocido por el experto en la técnica. En pocas palabras, para un inmunoanálisis competitivo en el que el análisis de actuación es una molécula no inmunógena comúnmente conocida como un hapteno se lleva a cabo el siguiente proceso: se producen anticuerpos por inmunización de un animal, preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno. El suero del animal inmunizado se recoge cuando el título de anticuerpos es suficientemente alto. Se añade un conjugado a una muestra que contiene el análisis de actuación y los anticuerpos, y el conjugado y el análisis compiten por la unión a los anticuerpos. El proceso puede comprender la fijación de dichos anticuerpos de suero a un sustrato de soporte tal como un soporte sólido de poliestireno o un biochip. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Sin embargo, si el anticuerpo policlonal es específico a TCG y lo bastante sensible, entonces el desarrollo y

costes adicionales necesarios para la producción del anticuerpo monoclonal son innecesarios. La señal emitida en el inmunoanálisis es proporcional a la cantidad de conjugado fijado a los anticuerpos, que a su vez es inversamente proporcional a la concentración del analito. La señal se detecta y después se semicuantifica (supera un nivel de corte) o cuantifica mediante comparación con uno o más calibradores.

5

Ejemplo 1: Preparación de 1-O-tricloroetil-2,3,4-tri-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranos ácido metil éster 1

Método A

A una solución de acetobromo- $\alpha$ -D-glucurónico ácido metil éster (5,96 g; 0,015 moles) en benceno anhidro (200 ml) se añadió carbonato de plata (4,14 g; 0,015 moles) y 2,2,2-tricloroetanol (14,2 ml). Después, la mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas y se enfrió a temperatura ambiente. La reacción se filtró y el filtrado resultante se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo (7/3) (v/v) para dar lugar a una solución de éster metílico de ácido acetobromo- $\alpha$ -D-glucurónico (3,0 g) y de éster metílico de ácido 1-O-tricloroetil-2,3,4-tri-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranurónico 1 (1,5 g) como un polvo blanco sólido.

10

15

Método B

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (15 ml) se añadió gota a gota a una solución enfriada a 0 °C de éster metílico de ácido 1,2,3,4-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranurónico (11,23 g; 0,03 mol) y 2,2,2-tricloroetanol (20 ml) en diclorometano anhidro (250 ml) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se lavó con 1N HCl (100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a sequedad. El éster metílico de ácido 1-O-tricloroetil-2,3,4-tri-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranurónico 1 (8,95 g) se obtuvo tras la recristalización del producto bruto a partir del éter.

20

Ejemplo 2: Preparación de glucurónido tricloroetílico (hapteno A)

A una solución de éster metílico de ácido 1-O-tricloroetil-2,3,4-tri-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranurónico 1 (5g ; 10,7 mM) en una mezcla de metanol (90 ml) y agua (10 ml) se añadió a 0 °C hidróxido de litio sólido (2,25 g; 53,7 mM). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El TLC indicó que la reacción se había completado. El metanol se eliminó en vacío, se añadió agua (100 ml) y la mezcla se neutralizó a pH 7 con una solución de HCl (1N). La solución se evaporó a sequedad y el sólido obtenido

25

se suspendió en metanol/cloroformo (1:4) y se agitó durante siete horas a temperatura ambiente. Las sales insolubles se eliminaron por filtración y la solución se evaporó a sequedad para dar hapteno A (3,1 g) como un sólido blanco.

5 Ejemplo 3: Preparación de homocisteína-tiolactona glucurónido tricloroetilico (hapteno A)

A una solución bajo nitrógeno de TCG (hapteno A) (1,25 g, 3,83mM) en piridina seca (25 ml) se añadió clorhidrato de homocisteína tiolactona (590 mg, 3,84 mM) e hidrocloreuro de EDC (885mg, 4,6 mm) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La piridina se eliminó a vacío y el residuo obtenido se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando metanol al 20 %/80 % de cloroformo para obtener 750 mg de la tiolactona homocisteína glucurónido tricloroetilico (hapteno B) como un sólido espumoso de color blanquecino.

Ejemplo 4: Conjugación de hapteno A con albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) (Inmunógeno I)

15 A una solución de TCG (Hapteno A) (40,0mg; 0,12 mmol) en DMF (1 ml) se le añadió N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (26,2mg; 0,123 mmol) y N-hidroxisuccinimida (14,13mg; 0,123 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La diciclohexilurea formada se separó por filtración y se añadió la solución gota a gota a una solución de BSA (100 mg; 1,5  $\mu$ mol) en una solución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). A continuación, la mezcla se agitó a 4 °C toda la noche y después se dializó contra tampón fosfato 50 mM con pH de 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C y se liofilizó.

20 Los resultados de MALDI mostraron que 29,92 moléculas de TCG (hapteno A) se habían conjugado con una molécula de BSA.

Ejemplo 5: Conjugación de hapteno A con BTG (Inmunógeno II)

25 A una solución de TCG (Hapteno A) (65,75 mg; 0,202 mmol) en DMF (1 ml) se le añadió N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (45,8 mg; 0,222 mmol) y N-hidroxisuccinimida (25,54 mg; 0,222 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La diciclohexilurea formada se separó por filtración y se añadió la solución gota a gota a una solución de BSA (100 mg; 1,5  $\mu$ mol) en una solución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). La mezcla se agitó a 4 °C toda la noche y después se dializó contra tampón fosfato 50 mM con pH de 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C y se liofilizó.

**Ejemplo 6: Conjugación de hapteno A a HRP**

EDC.HCl (10 mg) se disolvió en agua (0,5 ml) y se agregó inmediatamente a una solución de TCG (hapteno A) (2 mg) en DMF (0,2 ml). Después de mezclarse, esta solución se añadió gota a gota a una solución de 20 mg de BSA en 1 ml de agua. Se añadió Sulfo-NHS (5 mg) y la mezcla se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el exceso de hapteno con columnas dobles PD-10 (Pharmacia) en serie, equilibrado previamente con PBS (tampón fosfato salino) con pH 7,2. El conjugado hapteno-HRP se dializó durante la noche contra 10L de PBS a pH 7,2 a 4 ° C.

**Ejemplo 7: Conjugación del hapteno B a HRP modificado con maleimida**

El tricloroetileno glucurónido homocisteína tiolactona (hapteno B) (2 mg) se disolvió en una mezcla de DMF/agua (100 µl) y a esta solución se añadió hidróxido de potasio (2 M) (10 µl). La mezcla se dejó en reposo durante 10 minutos. Se añadió el tampón de fosfato (100 µl) para detener la reacción y el pH se ajustó a 7 añadiendo 0,1 M de HCl. Esta solución se añadió gota a gota a maleimida modificado con HRP (20 mg) disuelto en tampón fosfato (1 ml) y la solución se agitó a 4 °C durante la noche (protegida de la luz). Se eliminó el exceso de hapteno con columnas dobles PD-10 (Pharmacia) en serie, equilibrado previamente con PBS (tampón fosfato salino) con pH 7,2. El conjugado hapteno-HRP se dializó durante la noche contra 10L de PBS a pH 7,2 a 4 °C.

**Ejemplo 8: Desarrollo de un ELISA para TCG**

El TCG se acopla por medio de un agente de reticulación a la tiroglobulina bovina (Inmunógeno II, Ejemplo 5). El inmunógeno resultante se administró a ovejas adultas de forma mensual para obtener un antisuero policlonal específico. La IgG se extrajo a partir del antisuero y a través de la precipitación con ácido caprílico/sulfato de amonio de inmunoglobulina. Las placas de microtitulación (Thermo Scientific, 468667) se recubrieron con el anticuerpo (125 µl) en un tampón de recubrimiento (10 mM Tris pH 8,5) a 37 °C durante 2 horas. El anticuerpo fue revestido con 1,25 µg/ml. A continuación se lavaron las placas. Se añadieron 50 µl de la muestra o estándar (tricloroetileno glucurónido, Randox LK811; hidrato de cloral, Sigma C8383- 100 g; ácido tricloroacético, Fisher Scientific T/3000/50; ETG, Randox LK.589) a los pocillos apropiados por triplicado, seguido por 75 µl de hapteno-HRP conjugado en 1/4K e incubado a 25 °C durante 1 hora. A continuación se lavaron las placas y se añadieron 125 µl de TMB (Randox, 4380-15) a cada pocillo y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo con 125 µl de 0,2 M de ácido sulfúrico. La absorbancia se leyó a 450 nm con un lector de

microplacas ELISA (Bio-Tek Instruments, Elx800) y se calcularon las medidas. Finalmente, se determinó la especificidad y sensibilidad del anticuerpo.

Se advirtió a los inventores sobre la alta probabilidad de que el anticuerpo reconociera etil glucurónido, un metabolito del etanol. Dichas preocupaciones surgieron a raíz de la información divulgada de que se encontró un anticuerpo glucurónido de etilo en un ensayo comercial para reaccionar de forma cruzada, con lo que se dedujo que sería TCG (Arndt y col. 2009). Si se producía un fenómeno de reactividad cruzada inversa en la presente invención (es decir, la unión del anticuerpo TCG al etil glucurónido), el inmunoanálisis de hidrato de cloral no sería adecuado para el propósito, debido a la prevalencia de consumo social de alcohol. Sin embargo, como puede verse en la Tabla 1, el etil glucurónido no reacciona de forma cruzada con el anticuerpo de la invención, lo que demuestra una especificidad de anticuerpos sorprendentemente única.

### Resultados

Los resultados competitivos de ELISA en la Tabla 1 ponen de manifiesto la especificidad del anticuerpo de la invención hacia TCG.

**Tabla 1** Los datos de reactividad cruzada y la especificidad para el anticuerpo de la invención

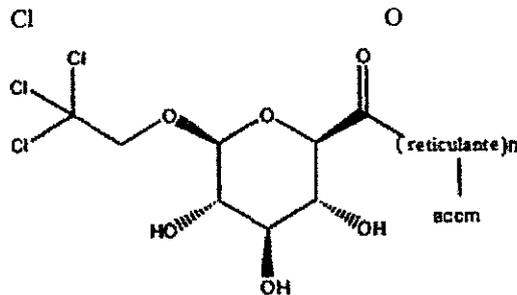
Estándar (ng/ml)	TCG		Estándar (ng/ml)	Hidrato de cloral		Ácido tricloroacético		EtG	
	A <sub>450</sub>	%B/B <sub>0</sub>		A <sub>450</sub>	%B/B <sub>0</sub>	A <sub>450</sub>	%B/B <sub>0</sub>	A <sub>450</sub>	%B/B <sub>0</sub>
0	1,516	100	0	1,523	100	1,504	100	1,364	100
1,25	1,313	86,6	31,25	1,457	95,7	1,372	91,2	1,183	86,7
2,5	1,228	81,0	62,5	1,516	99,5	1,391	92,5	1,144	83,9
5	1,061	70,0	125	1,455	95,5	1,389	92,4	1,157	84,8
10	0,872	57,5	250	1,324	86,9	1,312	87,2	1,130	82,8
20	0,641	42,3	500	1,359	89,2	1,284	85,4	1,094	80,2
40	0,465	30,7	1 000	1,277	83,8	1,230	81,8	1,031	75,6
80	0,373	24,6	2 000	1,195	78,5	1,094	72,7	0,950	69,6
IC <sub>50</sub>	13,274		IC <sub>50</sub>	>>2000		>>2000		>>2000	
% CR	100		%CR	<<0,69		<<0,69		<<0,69	

A<sub>450</sub> = absorbancia a 450 nm; B = absorbancia a 450 nm a x ng/ml de concentración estándar.

B<sub>0</sub> = absorbancia a 450 nm a 0 ng/ml de concentración estándar; IC<sub>50</sub> (ng/ml) = concentración estándar que produce el 50 % B/B<sub>0</sub>; %CR = porcentaje de reactividad cruzada basado en el 100 % de especificidad para TCG

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno de la estructura



5

donde  $n = 0$  o  $1$  y donde, cuando  $n = 1$ , el agente de reticulación se une al sustituyente carbonilo del anillo de tetrahidropirano al *accm*, el material portador que confiere antigenicidad.

10

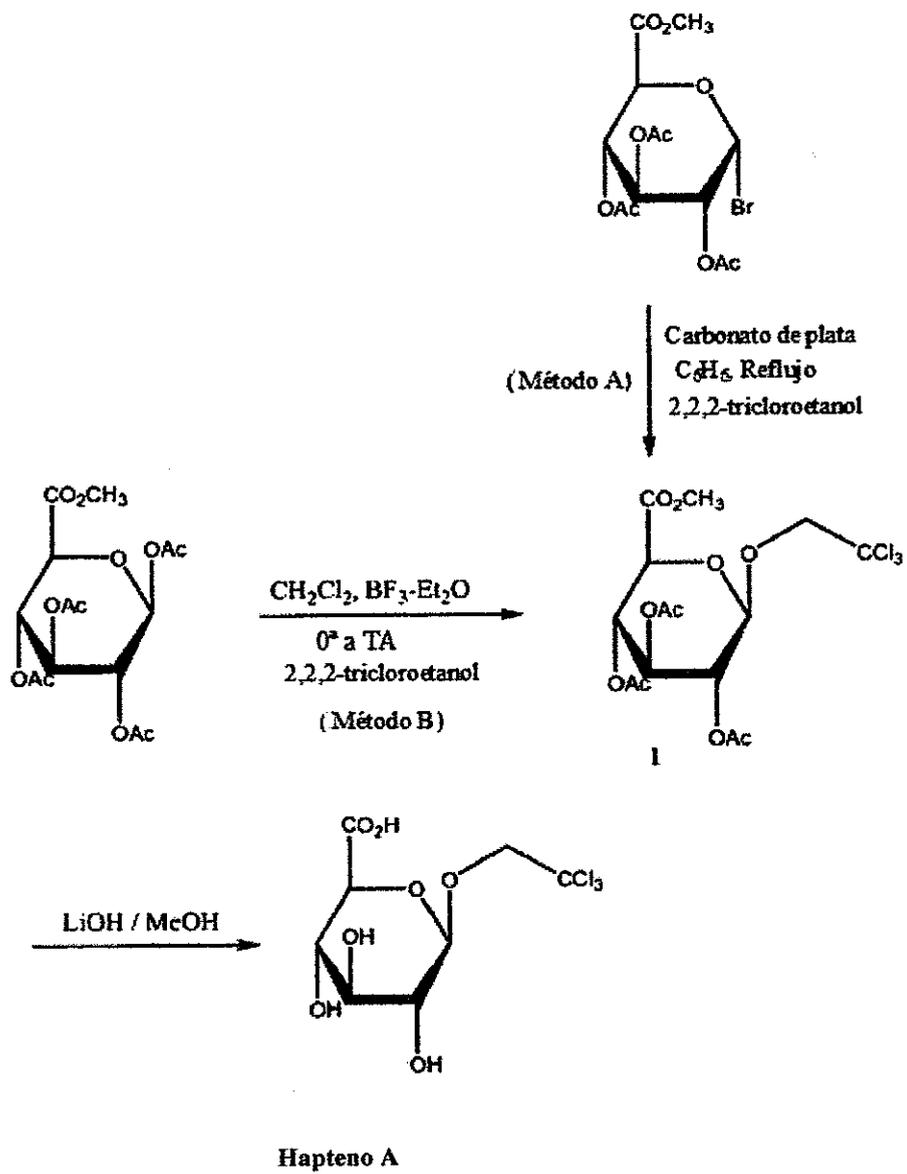
2. El agente de reticulación es preferiblemente  $-X-Y-Z-$ , donde  $X$  es un heteroátomo, preferiblemente nitrógeno, oxígeno o azufre;  $Y$  es un  $C_1-C_{10}$ , preferiblemente un  $C_2-C_6$ , fracción de cadena lineal de alquileo, o fracción de alquileo;  $Z$  (antes de la conjugación con el *accm*) se selecciona de carboxi, ditiopiridilo, maleimida, amino, hidroxilo, tiol, tioéster o una fracción de aldehído, más preferiblemente una fracción de aldehído.

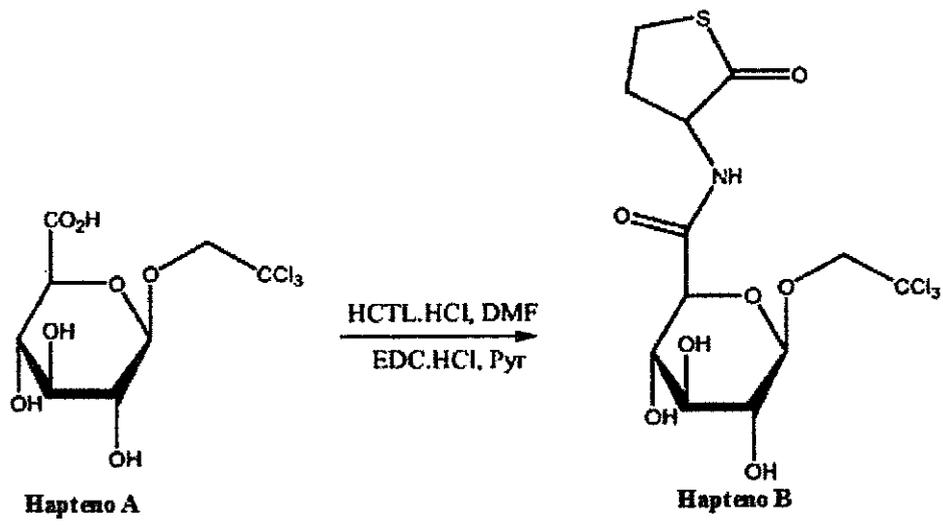
15

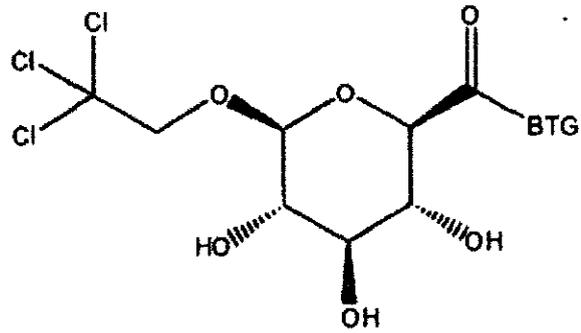
3. El inmunógeno de la Reivindicación 1 en la que  $n = 0$  y el *accm* es tiroglobulina bovina (Inmunógeno II).

4. Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de glucurónido tricloroetanol se caracteriza, además, por ser producido contra un inmunógeno de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.

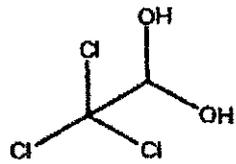
5. Un método para detectar la ingesta de hidrato de cloral: el método consiste en poner en contacto una muestra *in vitro* tomada de la persona con un conjugado y el anticuerpo de cualquiera de la Reivindicación 4, detectando el conjugado unido y deduciendo a partir de los valores del calibrador la presencia o cantidad de TCG.
- 5
6. Otro aspecto de la invención es un método para detectar y cuantificar el TCG en una persona o solución es el método que consiste en poner en contacto una muestra *in vitro*, tomada de la persona o una solución con un conjugado, y el anticuerpo de la Reivindicación 4, detectando el conjugado unido y deduciendo a partir de los valores del calibrador la presencia o cantidad de TCG.
- 10
7. El método de las Reivindicaciones 5 o 6 en el que una muestra *in vitro* es orina.
8. Un kit que incluye el anticuerpo de la Reivindicación 4 y un conjugado capaz de fijarse al anticuerpo.
- 15



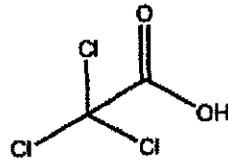




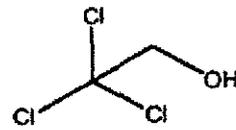
**Immunógeno II**



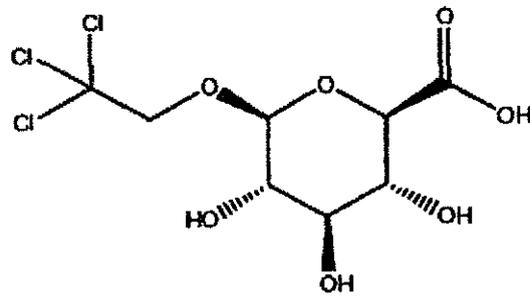
Hidrato de cloral



Ácido tricloroacético



2,2,2-Tricloroetanol



Tricloroetanol glucurónido