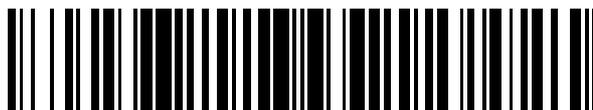


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 956**

51 Int. Cl.:

C07D 317/58 (2006.01)

C07K 17/06 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2004 E 04813874 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1701948**

54 Título: **Ensayo para detectar entactógenos**

30 Prioridad:

15.12.2003 US 736005

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

16.05.2014

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
1717 DEERFIELD ROAD
DEERFIELD, IL 60015, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, YI, FENG y
LIU, HSHIOU-TING**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 460 956 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).

ENSAYO PARA DETECTAR ENTACTÓGENOS**DESCRIPCIÓN****5 Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere a métodos, composiciones y kits para detectar la presencia y/o cantidades de 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilamfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA) en muestras que se sospecha que contienen las mismas. En particular, la invención se refiere a haptenos, inmunógenos y ensayos para detectar MDA, MDMA, MDEA y HMMA.

El campo del diagnóstico clínico ha presenciado una amplia expansión en los últimos años, tanto en lo que respecta a la variedad de materiales de interés que pueden determinarse de manera precisa y fácil, como en los métodos para la determinación. A lo largo de la última década, las pruebas para detectar drogas se han convertido en algo corriente. Estas pruebas no sólo son para la monitorización de delincuentes criminales y drogadictos, sino que los empresarios también las usan para la selección de trabajadores. En los últimos años, se ha investigado de manera extensa un inmunoensayo basado en la reacción de un anticuerpo con un antígeno para este fin. El inmunoensayo puede clasificarse en líneas generales en radioinmunoensayo, que usa un isótopo radiactivo, inmunoensayo enzimático (EIA) que usa una enzima y ensayos de luminiscencia, que usan marcadores fluorescentes, por ejemplo, polarización de fluorescencia, y marcadores quimioluminiscentes.

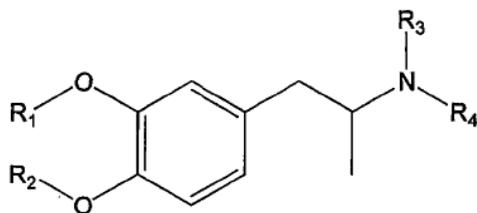
La anfetamina y metanfetamina estimulan el sistema nervioso central y se han usado en medicina para tratar hipotensión, narcolepsia y obesidad. Debido a sus efectos estimulantes, se ha abusado de los fármacos y derivados.

Las drogas de diseño, metilendioxfanfetamina (MDA), 1-3',4'-metilendioxfenil-2-propanamina, "píldoras del amor", metilendioxi-metanfetamina (MDMA), "Adam", "éxtasis" y metilendioxi-etilamfetamina (MDEA), "Eve" son entactógenos, que producen sensación de euforia y amistad. Estas drogas son populares actualmente y se denominan "drogas de fiesta". Se ha demostrado mediante varios estudios experimentales en ratas y seres humanos que estas drogas son peligrosas para los seres humanos. De hecho, se han notificado toxicidad y muertes asociadas con MDMA. Revisiones recientes también han notificado hepatotoxicidad, neurotoxicidad, psicopatología y abuso potencial de estas drogas. El uso común de estas drogas se ha generalizado en el mundo y aparecen recientemente como las drogas más populares en determinados países.

Aunque hay una necesidad para la detección de MDMA, MDA y sus metabolitos tales como 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), etcétera, la bibliografía da a conocer métodos de detección mediante CG-EM, HPLC, que son caros y requieren mucho tiempo. Parece que los investigadores han tratado de usar tecnología de inmunoensayo existente para anfetamina/metanfetamina para la detección de MDMA y MDA debido a su reactividad cruzada. La esperanza era que el anticuerpo que reconoce anfetamina y metanfetamina también sería útil para ensayos para detectar MDMA, MDA o sus metabolitos. Por ejemplo, se han investigado tres ensayos comerciales para detectar anfetamina/metanfetamina, concretamente, EMIT®, FPIA y RIA, para la detección de MDA, MDMA y MDEA. (Ruangyuttikarn, *et al.*, "Comparison of three commercial amphetamine immunoassays for detection of methamphetamine, methylene-dioxyamphetamine, methylenedioxy-methamphetamine and methylenedioxyethylamphetamine" *J. Anal. Toxicol.* 1988, 12, 229; Kunsman, *et al.*, "Application of the Syva Emit and Abbott TDX amphetamine Immunoassays to the detection of 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) and 3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) in Urine" *J. Anal. Toxicol.* 1990, 14, 149; Cody, J. T. "Detection of D, L-amphetamine, D,L-methamphetamine, and illicit amphetamine analogs using diagnostic products corporation's amphetamine and methamphetamine radioimmunoassay" *J. Anal. Toxicol.* 1990, 14, 321; Ensslin, *et al.*, "Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, "Eve") and its metabolites in urine by gas chromatography spectrometry and fluorescence polarization immunoassay" *J. Chromatogr.* 1996, B683, 189.

Sin embargo, según la bibliografía publicada, los enfoques anteriores han logrado poco éxito, si es que lo hay. Este resultado no es inesperado debido a las estructuras químicas muy diferentes entre análogos de metanfetamina y MDMA. Es decir, MDMA y MDA tienen un anillo de cinco miembros extra (metilendioxi) en comparación con metanfetamina y anfetamina, respectivamente.

K. TAKAGI *et al.*, "Synthesis of n-acyl derivatives of alfa-methyl-3,4-methylene-dioxyphenethylamine and their analgesic activity", CHEMICAL AND PHARMA-CEUTICAL BULLETIN, vol. 11, n.º 5, 1963, págs. 654-657, XP008100828, JP PHARMA-CEUTICAL SOCIETY OF JAPAN; Tokio da a conocer determinados compuestos de fórmula I



Fórmula I

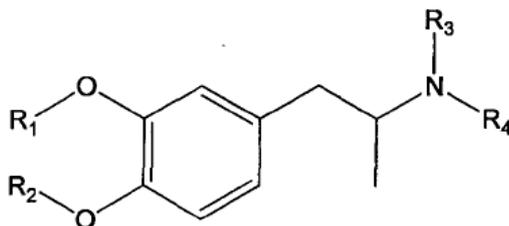
5 en la que uno de R^3/R^4 es $-C(O)(CH_2)_nR^5$. Los compuestos de la presente invención no comprenden un radical de este tipo.

10 El documento EP-A-1 340 981 da a conocer un "resto J-M-T" en la posición R^3/R^4 de compuestos similares a la fórmula I anterior, en el que J se define como 1-15 átomos de carbono y 0-6 heteroátomos, M se selecciona del grupo que consiste en $-O-$, $-CO-$, $-NR^4-$, $-S-$, $-C(=NH)O-$, $-NH(CO)-$, $-NH(CO)NH-$, $-NH(CS)-$, $-NH(CS)NH-$, $-O(CO)NH-$, $-NH(C=NH)-$ y maleimidotioéter, seleccionándose R^4 de hidrógeno y un grupo alquilo. T se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo saliente, un portador macromolecular y un marcador.

15 Por tanto, hay una necesidad de ensayos para la detección de las drogas de diseño mencionadas anteriormente y, en algunos casos, sus metabolitos principales. Los ensayos deben poder detectar las drogas de diseño con el fin de monitorizar y tratar pacientes adictos a estas drogas.

Sumario de la invención

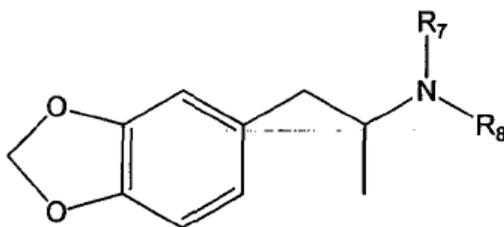
20 Una realización de la presente invención es un compuesto de fórmula:



Fórmula I

25 tal como se define en la reivindicación 1.

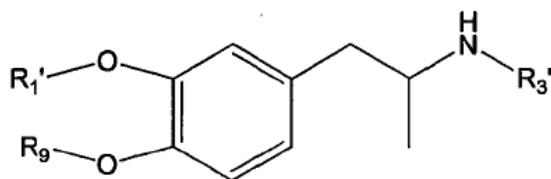
Otra realización de la presente invención es un compuesto de fórmula:



Fórmula II

30 tal como se define en la reivindicación 6.

35 Otra realización de la presente invención es un compuesto de fórmula:



Fórmula III

5 tal como se define en la reivindicación 7.

Otra realización de la presente invención es un método para determinar un compuesto seleccionado del grupo que
 10 consiste en 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-
 etilamfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA) tal como se explica resumidamente en las
 reivindicaciones 15 a 21 y 30 a 33.

Otra realización de la presente invención es un kit para determinar un compuesto seleccionado del grupo que
 15 consiste en 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-
 etilamfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA) tal como se explica resumidamente en las
 reivindicaciones 22 a 29.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una
 síntesis de inmunógeno de MDMA-KLH (10).

La figura 2 (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una
 síntesis de inmunógeno de MDA-KLH (14).

25 La figura 3 es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de haptenos de MDMA (15)-(17).

La figura 4A es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de haptenos de MDA (18)-(19).

30 La figura 4B es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de hapteno de MDA (20).

La figura 5 (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una
 síntesis de producto intermedio de HMMA (29) para el inmunógeno (30).

35 La figura 6 (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una
 síntesis de inmunógeno de HMMA-KLH (30).

La figura 7 es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de inmunógeno de HMMA-KLH
 (36).

40 La figura 8A es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de hapteno de MDMA (38).

La figura 8B (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una
 síntesis de producto intermedio de hapteno de MDMA (40).

45 La figura 9 (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una
 síntesis de inmunógeno de MDMA-KLH (52) o inmunógeno de MDMA-BSA (53).

La figura 10 (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de la
 50 síntesis de hapteno de MDA (55).

La figura 11 es un esquema de reacción que representa un ejemplo de la preparación de un conjugado con G6PDH
 de hapteno de MDA (19).

55 La figura 12 (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de la
 preparación de un conjugado con G6PDH del compuesto (8).

La figura 13 (que sólo es para fines de referencia) es un esquema de reacción que representa un ejemplo de la
 preparación de un conjugado con G6PDH del compuesto (51).

60 La figura 14 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo según la presente invención.

La figura 15 es una tabla que muestra la recuperación de MDMA a partir de un ensayo según la presente invención.

Descripción de las realizaciones específicas

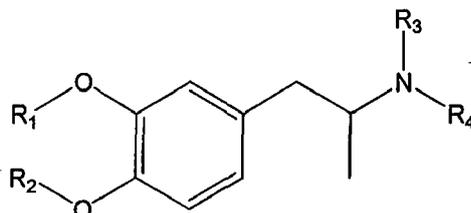
Se sintetizan proteínas que comprenden inmunógenos y se usan para preparar anticuerpos específicos para 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilamfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA). Los anticuerpos pueden usarse en métodos para detectar las drogas mencionadas anteriormente en muestras que se sospecha que contienen las drogas. Se preparan conjugados de marcador y pueden emplearse en los métodos anteriores. Puede realizarse el examen eficaz de muestras para detectar la presencia de uno o más entactógenos tal como se hizo referencia anteriormente.

Los inmunógenos y conjugados de marcador pueden implicar un análogo de MDA, MDMA, MDEA o HMMA unido a través del nitrógeno, o en el caso de HMMA alternativamente a través de la posición 4 del anillo de benceno, a una proteína o un marcador, respectivamente. El grupo de unión puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos sin contar el hidrógeno y puede comprender una cadena de desde 2 hasta 8 átomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste normalmente en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno, halógeno y fósforo. Cuando el grupo de unión proporciona el acoplamiento de una proteína a la posición 4 del anillo de benceno de HMMA, el grupo de unión comprende habitualmente al menos 5 átomos o, cuando es menos de 5 átomos, el grupo de unión no comprende únicamente carbono u oxígeno.

El número de heteroátomos en los grupos de unión oscilará normalmente entre aproximadamente 0 y 6, habitualmente entre aproximadamente 1 y 5. Los grupos de unión pueden ser alifáticos o aromáticos. Cuando están presentes heteroátomos, el oxígeno estará presente normalmente como oxo u oxi, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno estará presente normalmente como nitro, nitroso o amino, unido normalmente a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre será análogo al oxígeno; mientras que el fósforo estará unido a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, habitualmente como mono o diéster de fosfonato y fosfato. Funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre el grupo de unión y la molécula que va a conjugarse son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y ésteres de carboxilato, sulfonato y fosfato, amidas y tioésteres.

En la mayoría de los casos, cuando un grupo de unión tiene un grupo distinto de oxocarbonilo incluyendo análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, un agente alquilante tal como halo o tosialquilo, oxi (hidroxilo o el análogo de azufre, mercapto), oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona) o una olefina activa tal como una vinilsulfona o un éster α,β -insaturado, estas funcionalidades se unirán a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando se une una amina y ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se formarán amidas, amidinas y fosforamidas. Cuando se unen mercaptano y una olefina activada, se formarán tioéteres. Cuando se unen un mercaptano y un agente alquilante, se formarán tioéteres. Cuando se unen un aldehído y una amina en condiciones reductoras, se formará una alquilamina. Cuando se unen un ácido carboxílico o ácido de fosfato y un alcohol, se formarán ésteres. Se conocen bien en la técnica diversos grupos de unión; véase, por ejemplo, Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245:3059.

Tal como se mencionó anteriormente, un aspecto se refiere a compuestos de fórmula:



en la que:

R^1 es H, alquilo inferior, un grupo protector o se toma junto con R^2 para formar un anillo, que puede ser un anillo de cinco o seis miembros, habitualmente un anillo de cinco miembros;

R^2 es H, alquilo inferior, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^6$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^6)=CH_2$, o se toma junto con R^1 para formar un anillo,

R^3 y R^4 son independientemente H o alquilo inferior o un grupo protector, o, cuando R^1 se toma junto con R^2 para formar un anillo, al menos uno, preferiblemente uno, de R^3 o R^4 es $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^5$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^5$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^5$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^5)=CH_2$, o cuando R^1 no se toma junto con R^2 para formar un anillo, R^2 no es H o alquilo inferior

R⁵ es H, -OH, -SH, -O-alquilo inferior, halógeno (bromo, cloro, yodo, flúor, habitualmente, bromo o cloro), -NH₂, -succinimidilo, -maleimidilo, portador inmunogénico o marcador,

5 R⁶ es H, -OH, -SH, -O-alquilo inferior, halógeno, NH₂, -succinimidilo, -maleimidilo, portador inmunogénico o marcador, y

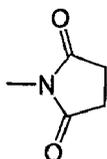
n es un número entero de desde 1 hasta 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2 ó 1,

10 e incluyendo sales de ácido de los mismos.

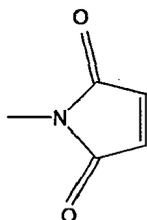
Mediante el término "alquilo inferior" quiere decirse un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10, habitualmente, de 1 a 5, átomos de carbono, tal como metilo, etilo, propilo, butilo y pentilo, e incluyendo las formas normal, secundaria, terciaria y similares de los mismos cuando sea apropiado.

15 Mediante el término "sales de ácido de los mismos" quiere decirse sales formadas con ácidos tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácido clorhídrico y similares, ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido trifluoroacético y similares.

20 Mediante "-succinimidilo" quiere decirse lo siguiente:



Mediante "-maleimidilo" quiere decirse lo siguiente:



25 Mediante el término "marcador" quiere decirse un miembro de un sistema de producción de señales. El marcador puede detectarse directamente o puede detectarse a través de una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Los marcadores son generalmente radioisotópicos, luminiscentes, particulados o enzimáticos. El marcador puede ser un poli(aminoácido), o una proteína, o un compuesto distinto de poli(aminoácido), isotópico o no isotópico, habitualmente no isotópico, y puede ser un catalizador, tal como una enzima, un polinucleótido que codifica para un catalizador, un promotor, un colorante, una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña, una secuencia de polinucleótido amplificable, una partícula tal como una partícula de látex o carbono, un sol de metal, una unidad cristalina, un liposoma, una célula, etc., que puede estar marcado o no adicionalmente con un colorante, un catalizador u otro grupo detectable y similares.

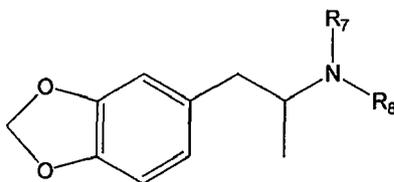
40 El término "marcadores distintos de poli(aminoácido)" se refiere a los marcadores que no son proteínas tales como enzimas. Un marcador distinto de poli(aminoácido) puede ser un miembro de un sistema de producción de señales. El marcador distinto de poli(aminoácido) puede detectarse directamente o puede detectarse a través de una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Los marcadores distintos de poli(aminoácido) son generalmente radioisotópicos, luminiscentes, particulados, polinucleotídicos o similares. Más particularmente, el marcador puede ser isotópico o no isotópico, habitualmente no isotópico, y puede ser un polinucleótido que codifica para un catalizador, un promotor, un colorante, una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña, una secuencia de polinucleótido amplificable, una partícula tal como una partícula de látex o carbono, un sol de metal, una unidad cristalina, un liposoma, una célula, etc., que puede estar marcado o no adicionalmente con un colorante, un catalizador u otro grupo detectable y similares.

50 El sistema de producción de señales puede tener uno o más componentes, siendo al menos un componente el marcador. El sistema de producción de señales genera una señal que se relaciona con la presencia de un entactógeno en una muestra. El sistema de producción de señales incluye todos los reactivos requeridos para producir una señal medible. Pueden incluirse otros componentes del sistema de producción de señales en una disolución de revelador y pueden incluir sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes,

cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos, sustancias de unión específica requeridas para la unión de sustancias generadoras de señales y similares. Otros componentes del sistema de producción de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores y similares. El sistema de producción de señales proporciona una señal detectable por medios externos, mediante el uso de radiación electromagnética, deseablemente mediante examen visual. Se describen sistemas de producción de señales a modo de ejemplo en la patente estadounidense n.º 5.508.178 (Rose, *et al.*).

Mediante el término "portador inmunogénico" quiere decirse un grupo que, cuando se conjuga con un hapteno y se inyecta en un mamífero, inducirá una respuesta inmunitaria y provocará la producción de anticuerpos que se unen al hapteno. Los haptenos son compuestos que pueden unirse específicamente a anticuerpos correspondientes, pero no actúan en sí mismos como inmunógenos (o antígenos) para la preparación de los anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos que reconocen un hapteno contra compuestos formados por el hapteno unido a un portador inmunogénico (o antigénico). Los portadores inmunogénicos también se denominan portadores antigénicos. Los portadores inmunogénicos típicos incluyen, sin limitación, poli(aminoácidos), polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas (materiales biológicos y sintéticos). Se da a conocer una amplia variedad de tales portadores en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, columna 4, línea 57 a columna 5, línea 5. Los portadores inmunogénicos incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas, proteínas séricas, por ejemplo, globulinas, proteínas y lipoproteínas de cristalino ocular, etcétera. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana ("KLH"), ovoalbúmina de huevo, gamma-globulina bovina (BGG) y similares.

Se incluyen dentro de los compuestos anteriores compuestos de fórmula:



en la que:

R^7 es H, alquilo inferior, un grupo protector, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^5$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^5$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^5$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^5)=CH_2$,

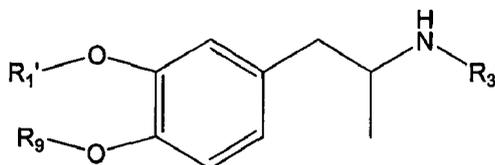
R^8 es H, alquilo inferior, un grupo protector, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^5$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^5$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^5$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^5)=CH_2$,

R^5 es H, -OH, -SH, -O-alquilo inferior, halógeno, NH_2 , -NH-proteína en el que la proteína es un marcador o un inmunógeno, -succinimidilo, -maleimidilo o un marcador distinto de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido), y n es un número entero de desde 1 hasta 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2 ó 1,

con la condición de que al menos uno de R^7 y R^8 no son H o alquilo inferior,

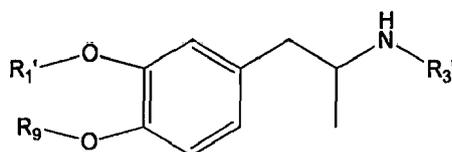
e incluyendo las sales de ácido de los mismos.

También se incluyen dentro de los compuestos anteriores compuestos de fórmula:



según la reivindicación 7.

También se incluyen dentro de los anteriores compuestos de fórmula:



en la que:

R³ es metilo o etilo,

R¹ es alquilo inferior,

5

R⁹ es -(CH₂)_nSCH₂C(O)R⁶, -(CH₂)_nR⁶ o -(CH₂)_nC(SO₂R⁶)=CH₂,

R⁶ es H, -OH, -SH, -O-alquilo inferior, halógeno, NH₂, -NH-proteína en el que la proteína es un marcador o un inmunógeno, -succinimidilo, -maleimidilo o un marcador distinto de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido), y

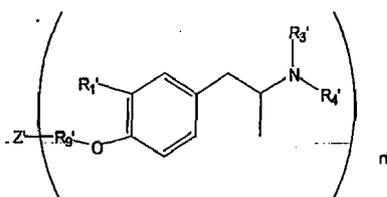
10

n es un número entero de desde 1 hasta 5,

e incluyendo sales de ácido de los mismos.

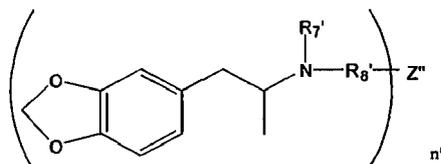
15

Otra realización es un compuesto de fórmula:



20 según la reivindicación 2.

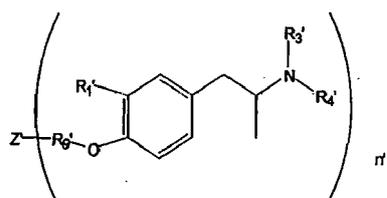
Otra realización es un compuesto de fórmula:



25

según la reivindicación 5.

Otra realización es un compuesto de fórmula:

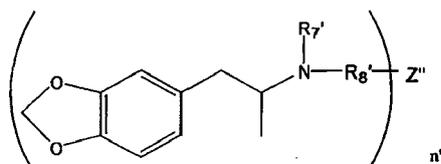


30

según la reivindicación 3.

Otra realización es un compuesto de fórmula:

35



según la reivindicación 4.

40 Síntesis

La síntesis de ejemplos representativos, pero no necesariamente de la invención, de los compuestos anteriores se comenta en el presente documento a modo de ilustración. Se sugerirán otros procedimientos sintéticos a los

expertos en la técnica en vista de la descripción en el presente documento. Pueden prepararse otros compuestos dentro del alcance de la presente invención usando variantes adecuadas de los reactivos empleados a continuación.

Puede sintetizarse inmunógeno de MDMA-KLH (10) mediante un procedimiento explicado resumidamente en la figura 1 que sólo es para fines de referencia. Se hace reaccionar MDMA (1) con bromoacetato de metilo en presencia de una base para dar el compuesto 7. Las bases adecuadas incluyen hidruros de metal tales como, por ejemplo, NaH, CaH₂, etc., carbonato de sodio, carbonato de potasio y similares, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, dimetilformamida (DMF), éteres orgánicos, por ejemplo, etil éter, tetrahidrofurano (THF), dioxano y similares. Puede lograrse la hidrólisis del compuesto 7 en un medio orgánico-acuoso en presencia de una base tal como, por ejemplo, hidróxido de amonio en un alcohol tal como metanol, etanol y similares, carbonato de potasio, sodio, hidróxido de sodio y similares, en metanol acuoso, etanol, etcétera. Tras la hidrólisis, se reduce el pH del medio a de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 mediante la adición de un ácido tal como un ácido mineral o un ácido orgánico tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido clorhídrico y similares. Se hace reaccionar el ácido 8 resultante para formar un producto intermedio activado, habitualmente un éster activado. En un enfoque a modo de ejemplo, se trata el ácido 8 con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) para producir el producto intermedio de éster activado deseado 9. La reacción del producto intermedio 9 con una proteína tal como KLH en una disolución tampón tal como un tampón fosfato, por ejemplo, fosfato de sodio (0,1 M, pH = 8,0), da el inmunógeno deseado 10. Este último compuesto puede purificarse mediante técnicas conocidas tales como, por ejemplo, diálisis, cromatografía y combinaciones de las mismas. El acoplamiento de una proteína al resto de unión de la molécula es habitualmente por medio de grupos amino en una proteína, en los que el nitrógeno del grupo amino puede considerarse el nitrógeno de un grupo de unión.

En la figura 2, que sólo es para fines de referencia, se representa una síntesis a modo de ejemplo del inmunógeno de MDA-KLH 14. La síntesis se lleva a cabo de una manera similar a la descrita anteriormente para la síntesis del compuesto 10.

La siguiente discusión se refiere a las síntesis de haptenos de MDMA para su posterior reacción para formar conjugados inmunogénicos de proteínas. El compuesto de partida en cada uno de los esquemas de reacción mostrados en la figura 3 es MDMA (1). Las temperaturas de reacción son aproximadamente temperatura ambiental, es decir, aproximadamente 25°C. Para la preparación del compuesto 15, se hace reaccionar MDMA (1) con un éster activado de ácido bromoacético, concretamente, el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético en este ejemplo, en condiciones básicas, que incluyen incorporar en la mezcla de reacción una alquilamina tal como, por ejemplo, diisopropiltilamina, etilamina, trietilamina y similares. La reacción se realiza en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un éter, por ejemplo, THF, etil éter, etcétera. Para la preparación del compuesto 16, se hace reaccionar MDMA (1) con un éster activado de bromoacetilglicina, concretamente, el éster de N-hidroxisuccinimida en el ejemplo mostrado en la figura 3. La reacción se lleva a cabo en condiciones básicas con un disolvente orgánico tal como se comentó anteriormente para la preparación del compuesto 15. Para la preparación de la vinilsulfona 17, se hace reaccionar MDMA (1) con un compuesto activado, concretamente, en el ejemplo mostrado, un reactivo doblemente activado, es decir, 1,3-dibromo-2-(metilsulfonyl)propano. El reactivo doblemente activado reacciona con el resto amina de MDMA en presencia de una base tal como, por ejemplo, un hidruro de metal, por ejemplo, hidruro de sodio, hidruro de calcio, un carbonato, por ejemplo, carbonato de potasio, carbonato de sodio y similares.

Puede aplicarse una química similar a la preparación de haptenos de MDA tal como se muestra en las figuras 4A y 4B. Para la preparación del compuesto 18, se hace reaccionar MDA (4) con un éster activado de ácido bromoacético, por ejemplo, el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético en este ejemplo, en condiciones básicas, tal como se comentó anteriormente para la preparación del compuesto 15. Para la preparación del compuesto 19, se hace reaccionar MDA (4) con un éster activado de bromoacetilglicina, concretamente, el éster de N-hidroxisuccinimida en el ejemplo mostrado en la figura 4A. La reacción se lleva a cabo en condiciones básicas con un disolvente orgánico tal como se comentó anteriormente para la preparación del compuesto 16. Para la preparación de la vinilsulfona 20 (figura 4B), se hace reaccionar MDA (4) con un compuesto activado, concretamente, en el ejemplo mostrado, un reactivo doblemente activado, es decir, 1,3-dibromo-2-(metilsulfonyl)propano. El reactivo doblemente activado reacciona con el resto amina de MDMA en condiciones básicas tal como se comentó anteriormente para la preparación del compuesto 17. Además del producto de monoalquilación preferido 20, se obtiene un producto de dialquilación 21, que tiene dos restos vinilsulfona en el átomo de nitrógeno. Para lograr la monoalquilación, la reacción se lleva a cabo a temperatura inferior tal como, por ejemplo, de aproximadamente -10°C a aproximadamente -50°C, habitualmente, de aproximadamente -20°C a aproximadamente -30°C y se emplea una cantidad controlada del reactivo doblemente activado, concretamente, una razón de reactivo aproximada de aproximadamente 1 con respecto a aproximadamente 1. De este modo, puede obtenerse exclusivamente el producto de monoalquilación con rendimientos que son del 80% o mayores.

En la figura 5 y la figura 6, que son sólo para fines de referencia, se representa una síntesis a modo de ejemplo de un inmunógeno de HMMA. Haciendo referencia a la figura 5, se somete la cetona 22 a aminación reductora en un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se hace reaccionar la cetona 22, por ejemplo, con clorhidrato de metilamina en condiciones básicas. Generalmente, se emplea un medio acuoso tamponado que contiene un disolvente orgánico, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol o similares. Esta etapa produce el compuesto intermedio 23, que se trata con un agente reductor tal como un hidruro de metal, por ejemplo, NaBH₃CN en un

disolvente orgánico tal como un alcohol, por ejemplo, metanol y similares. El medio acuoso puede contener un tampón carbonato tal como carbonato de sodio, carbonato de potasio y similares. El compuesto 24 se obtiene y se trata para proteger la funcionalidad amina, produciendo así el compuesto 25. Se conocen bien en la técnica grupos protectores adecuados y se han descrito en detalle en numerosas patentes y artículos en la bibliografía técnica. Véanse, por ejemplo, "Principles of Peptide Synthesis" (M. Bodanszky, Springer Verlag, Berlín, Heidelberg, Nueva York, Tokio (1984)). Ejemplos de tales grupos protectores, a modo de ejemplo y no de limitación, son t-butoxicarbonilo (t-Boc), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetaminometilo (Acm), trifenilmetilo (Trt), benciloxicarbonilo, bifenilisopropiloxicarbonilo, 1-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, alfa-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2-ciano-1,1-dimetiletoxicarbonilo, bromobenciloxilo, carbamilo, formilo y similares. El grupo protector particular elegido depende de la naturaleza de la reacción que va a realizarse y las condiciones de tal reacción tales como temperatura, pH, etcétera.

Haciendo de nuevo referencia a la figura 5, el grupo protector empleado en esta síntesis a modo de ejemplo es dicarbonato de di-terc-butilo ((tBoc)₂O) en un disolvente orgánico-acuoso tal como un éter, por ejemplo, THF y similares. Se incluye un carbonato adecuado tal como carbonato de potasio, carbonato de sodio y similares, en el medio de reacción para proporcionar condiciones básicas. La reacción de 25 con bromoacetato de metilo en presencia de un hidruro de metal, por ejemplo, NaH, en un disolvente orgánico, por ejemplo, DMF, produce el compuesto 26. El grupo protector se elimina en condiciones ácidas en un disolvente orgánico para dar el compuesto 27. En el ejemplo representado, se trata el compuesto 26 con ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno. En general, la eliminación del grupo protector depende de la naturaleza del grupo protector. Se conocen bien en la técnica condiciones adecuadas para la eliminación de grupos protectores. Se trata el compuesto 27 para convertirlo en el compuesto de sal de ácido clorhídrico 28. Las condiciones a modo de ejemplo implican la hidrólisis en condiciones básicas tales como, por ejemplo, un carbonato tal como carbonato de potasio en un disolvente orgánico tal como metanol. Posteriormente, se añade ácido clorhídrico para formar la sal de ácido clorhídrico. Se trata el compuesto 28 para formar el compuesto de éster activado 29. Las condiciones a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, la reacción con EDAC y NHS. Haciendo referencia a la figura 6, se obtiene el inmunógeno 30 mediante la reacción del compuesto 29 con una proteína, por ejemplo, KLH y similares, en un tampón adecuado con pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,0, preferiblemente, de aproximadamente 8, tal como, por ejemplo, un tampón fosfato, por ejemplo, fosfato de sodio (0,1 M, pH = 8,0) y similares. El inmunógeno 30 puede purificarse tal como se comentó anteriormente.

La síntesis de otros inmunógenos de HMMA puede lograrse (figura 7) usando el compuesto intermedio común 25. Puede lograrse la alquilación del grupo fenólico del compuesto 25 usando un alcano diactivado adecuado tal como, por ejemplo, dibromoetano, etcétera, en condiciones básicas tales como, por ejemplo, un carbonato, por ejemplo, carbonato de potasio y similares, en un disolvente orgánico tal como un compuesto aromático, por ejemplo, tolueno y similares. El producto de la reacción anterior, concretamente el compuesto 31, se trata con una sal de tioéster de un ácido orgánico tal como, por ejemplo, triacetato de potasio, tiopropanoato de potasio y similares, en un disolvente orgánico-acuoso tal como metanol-agua, etcétera. Entonces se trata el compuesto resultante 32 para eliminar el grupo protector e hidrolizar el acetato, de una manera similar a la descrita anteriormente, para obtener el compuesto de tiol 34. Se obtiene bromoacetil-KLH 35 mediante la reacción de KLH con un éster activado de ácido bromoacético, concretamente, el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético en este ejemplo, en condiciones básicas, tal como se comentó anteriormente para la preparación del compuesto 15. La reacción del tiol 34 con bromoacetil-KLH 35 produce el compuesto inmunogénico 36, que puede purificarse tal como se comentó anteriormente.

En la figura 8 se expone la síntesis del hapteno de HMMA-vinilsulfona 38. La reacción del compuesto 25 con 1,3-dibromo-2-(metilsulfonyl)propano en condiciones básicas da el compuesto 37. Las reacciones son similares a las descritas anteriormente para las síntesis de la figura 4. Se obtiene el hapteno 38 mediante la eliminación del grupo protector tal como se comentó anteriormente.

Haciendo de nuevo referencia a la figura 8, la alquilación del fenol 25 con, por ejemplo, bromoacetnitrilo, en condiciones básicas tales como, por ejemplo, un carbonato en un disolvente orgánico, da el compuesto intermedio 39. Las condiciones básicas son similares a las descritas anteriormente. En el ejemplo representado, se emplea carbonato de potasio en DMF a temperatura elevada, por ejemplo, aproximadamente 80°C. La reducción de 39 con un hidruro de metal tal como, por ejemplo, NaBH₄ y similares, en presencia de un haluro de metal del grupo VIII (cloruro, bromuro, fluoruro y yoduro) tal como, por ejemplo, CoCl₂, FeCl₂, etcétera, produce la amina 40, que puede emplearse para sintetizar un hapteno y también un inmunógeno mediante la reacción con un portador inmunogénico.

Haciendo referencia a la figura 9, que sólo es para fines de referencia, la síntesis del compuesto 51 comienza con la reacción de clorhidrato de MDMA con 5-bromovalerato de etilo en condiciones básicas para dar el compuesto 50. Las condiciones básicas incluyen, por ejemplo, una base inorgánica, por ejemplo, un carbonato, por ejemplo, carbonato de potasio, carbonato de sodio y similares en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, una formamida, por ejemplo, dimetilformamida (DMF), etcétera. La hidrólisis de 50 dio el ácido 51. La hidrólisis puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando una base inorgánica tal como, por ejemplo, un hidróxido de metal, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y similares en un disolvente orgánico oxigenado tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol, etanol, etcétera. El ácido 51 se acopla a una proteína dando inmunógenos de KLH

(52) y BSA (53). Se activó el ácido 51 mediante éster de NHS y DCC y le siguió una reacción con amina a partir o bien de KLH o bien de BSA para dar los inmunógenos 52 y 53, respectivamente.

Los ensayos de la presente invención habitualmente implican reacciones entre parejas de unión tales como un analito de entactógeno y un anticuerpo correspondiente o la unión entre un anticuerpo y una pareja de unión correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo. Por consiguiente, la pareja de unión puede ser una proteína, que puede ser un anticuerpo o un antígeno. La pareja de unión puede ser un miembro de un par de unión específica ("miembro de sbp", "*specific binding pair*"), que es una de dos moléculas diferentes, que tiene una zona en la superficie o en una cavidad que se une específicamente a, y de ese modo se define como complementaria con, una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específica serán habitualmente miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específica tales como biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácido nucleico, IgG-proteína A, pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN y similares no son pares inmunológicos pero se incluyen dentro del alcance de miembro de sbp.

Por consiguiente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes por la otra en comparación con sustancialmente menos reconocimiento de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de varios factores incluyendo interacciones hidrófobas entre moléculas. Parejas de unión preferidas son anticuerpos.

Los inmunógenos preparados según la presente invención pueden emplearse para preparar anticuerpos específicos para un entactógeno respectivo mencionado anteriormente. Un anticuerpo es una inmunoglobulina que se une específicamente a, y de ese modo se define como complementaria, a una organización espacial y polar particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede prepararse mediante técnicas que se conocen bien en la técnica tales como inmunización de un huésped y recogida de sueros (policlonal) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recogiendo la proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican para al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales.

Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab' y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión por una molécula particular.

Se obtiene antisuero que contiene anticuerpos (policlonales) mediante técnicas bien establecidas que implican inmunización de un animal, tal como un conejo, una cobaya o una cabra, con un inmunógeno apropiado y obtención de antisueros de la sangre del animal inmunizado tras un periodo de espera apropiado. Se proporcionan revisiones del estado de la técnica por Parker, *Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds*, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., EE.UU., 1976), Butler, J. *Immunol. Meth.* 7: 1-24 (1975); Broughton y Strong, *Clin. Chem.* 22: 726-732 (1976); y Playfair, *et al.*, *Br. Med. Bull.* 30: 24-31 (1974).

También pueden obtenerse anticuerpos mediante técnicas de hibridación de células somáticas, denominándose tales anticuerpos comúnmente anticuerpos monoclonales. Pueden producirse anticuerpos monoclonales según las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975. Se encuentran revisiones de técnicas de anticuerpos monoclonales en *Lymphocyte Hybridomas*, ed. Melchers, *et al.* Springer-Verlag (Nueva York 1978), *Nature* 266: 495 (1977), *Science* 208: 692 (1980) y *Methods of Enzymology* 73 (Parte B): 3-46 (1981). Se inyectan muestras de una preparación de inmunógeno apropiado en un animal tal como un ratón y, tras un tiempo suficiente, se sacrifica el animal y se obtienen células del bazo. Alternativamente, pueden sensibilizarse las células del bazo de un animal no inmunizado al inmunógeno *in vitro*. Pueden comprimirse los cromosomas de células del bazo que codifican para las secuencias de bases de las inmunoglobulinas deseadas fusionando las células del bazo, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol, con una línea celular de mieloma. Se deja que las células resultantes, que incluyen hibridomas fusionados, crezcan en un medio selectivo, tal como medio HAT, y se hacen crecer las células inmortalizadas supervivientes en tal medio usando condiciones de dilución limitante. Se hacen crecer las células en un recipiente adecuado, por ejemplo, pocillos de microtitulación, y se examina el sobrenadante para seleccionar anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada.

Existen diversas técnicas para potenciar los rendimientos de anticuerpos monoclonales, tales como inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped mamífero, que acepta las células, y recogida del líquido ascítico. Cuando se reúne una cantidad insuficiente del anticuerpo monoclonal en el líquido ascítico, se recoge el anticuerpo de la sangre del huésped. Alternativamente, puede hacerse crecer la célula que produce el anticuerpo deseado en un dispositivo de cultivo celular de fibras huecas o un dispositivo de frasco centrifugador, ambos de los cuales se conocen bien en la técnica. Existen diversas maneras convencionales para el aislamiento y la purificación de los anticuerpos monoclonales con respecto a otras proteínas y otros contaminantes (véase Köhler y Milstein, citado anteriormente).

En otro enfoque para la preparación de anticuerpos, puede escindirse del ADN cromosómico la secuencia que codifica para los sitios de unión del anticuerpo e insertarse en un vector de clonación, que puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los sitios de unión del anticuerpo correspondientes.

En general, pueden purificarse anticuerpos mediante técnicas conocidas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía de DEAE, cromatografía de ABx y similares, filtración, etcétera.

Un análogo de analito es un analito modificado, que puede competir con el analito análogo por un receptor, proporcionando la modificación medios para unir un análogo de analito a otra molécula. El análogo de analito diferirá habitualmente del analito en más que el reemplazo de un hidrógeno por un enlace que une el análogo de analito a un centro o marcador, pero no es necesario. El análogo de analito puede unirse al receptor de una manera similar al analito. El análogo puede ser, por ejemplo, un conjugado de marcador del analito, un anticuerpo dirigido contra el idiotipo de un anticuerpo frente al analito y similares.

Tal como se indicó anteriormente, los análogos de analito incluyen conjugados de marcador, que pueden prepararse a partir de algunos de los haptenos descritos anteriormente mediante la incorporación de un marcador deseado. Los dos componentes pueden unirse entre sí, opcionalmente a través de un grupo de unión, para formar una única estructura. La unión puede ser o bien acoplamiento covalente tal como mediante una conexión directa, por ejemplo, un enlace químico, entre los componentes o entre los componentes y un grupo de unión o bien acoplamiento no covalente que implica unión específica entre miembros de un par de unión específica (sbp) complementarios que se acoplan a los componentes. Los procedimientos empleados para la conjugación se conocen bien en la técnica.

Normalmente, para el acoplamiento covalente, uno o más de los componentes contiene un grupo funcional adecuado para el acoplamiento a uno o más de los otros componentes. Los grupos funcionales adecuados para el acoplamiento de los componentes pueden ser funcionalidades carbonilo, tanto oxocarbonilo, por ejemplo, aldehído, como distintas de oxocarbonilo (incluyendo análogos de azufre y nitrógeno) por ejemplo, carboxilo, amidina, amidato, tiocarboxilo y tionocarboxilo. Las funcionalidades alternativas de oxo incluyen halógeno activo, diazo, mercapto, olefina, particularmente olefina activada, amino, fosforo y similares. Son de particular interés los ésteres activados o agentes alquilantes. Se conocen bien en la técnica detalles de técnicas para acoplar moléculas entre sí. Véanse, por ejemplo, Matthews, *et al.*, Anal. Biochem. (1985) 151:205-209; Engelhardt, *et al.*, solicitud de patente europea n.º 0302175 y patente estadounidense n.º 3.817.837.

Tal como se indicó anteriormente, los componentes, es decir, el hapteno y el marcador, de los reactivos pueden acoplarse entre sí de manera no covalente. Por ejemplo, puede incorporarse una molécula orgánica pequeña tal como, por ejemplo, biotina incluyendo bis-biotina, fluoresceína o similares en uno de los componentes y puede unirse el otro componente a una pareja de unión para la molécula orgánica pequeña tal como, por ejemplo, respectivamente, estreptavidina, anticuerpo anti-fluoresceína o similares. La unión de las parejas de unión da como resultado el acoplamiento no covalente de los componentes entre sí.

Ensayos

Los reactivos mencionados anteriormente pueden emplearse en todos los tipos de inmunoensayos para determinar la presencia y/o cantidad de analitos de entactógenos en una muestra que se sospecha que contiene tales analitos. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados comprenden habitualmente la formación de complejos antígeno-anticuerpo relativamente grandes. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas de dispersión de luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos antígeno-anticuerpo. Los inmunoensayos marcados incluyen inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayo de inhibición, ensayo de canalización de oxígeno luminiscente, etcétera.

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos de antígenos o haptenos que usan analito marcado con una concentración de anticuerpo limitada.

Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de todos los reactivos principales. Tales ensayos incluyen ensayos de tipo sándwich de dos sitios, por ejemplo, ensayos inmunoradiométricos, ensayos inmunofluorométricos, ensayos inmunoquimioluminométricos, ensayos ELISA, etcétera. Otro grupo de inmunoensayos incluye inmunoensayos de precipitación, nefelométricos y turbidimétricos, inmunoensayos de aglutinación de partículas, inmunoensayos de recuento de partículas y similares. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos sin separación en los que los reactivos marcados modulan la señal del marcador tras reacciones de unión antígeno-anticuerpo. Otro grupo de ensayos incluyen ensayos competitivos limitados de reactivos de anticuerpo marcado para detectar hapteno o antígeno que evitan el uso de haptenos o antígenos marcados problemáticos. En este tipo de ensayo, es importante que el analito inmovilizado en la fase sólida esté presente en una cantidad constante, limitada. El reparto de un marcador entre el analito inmovilizado y el analito libre depende de la concentración de analito en la muestra.

Los haptenos, conjugados de marcador y anticuerpos mencionados anteriormente pueden emplearse para realizar un inmunoensayo para detectar los analitos de entactógenos MDA, MDMA, HMMA y/o MDEA. Los ensayos pueden realizarse o bien sin separación (homogéneos) o bien con separación (heterogéneos) de cualquiera de los productos o componentes del ensayo. Se muestran a modo de ejemplo inmunoensayos homogéneos mediante el ensayo EMIT® (Syva Company, San Jose, CA) dado a conocer en Rubenstein, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.817.837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los dados a conocer en Ullman, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.996.345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los dados a conocer en Maggio, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.233.402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") tal como se da a conocer, por ejemplo, entre otros, en la patente estadounidense n.º 5.354.693; etcétera.

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por modulador enzimático ("EMMIA") comentado por Ngo y Lenhoff, *FEBS Lett.* (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia de sustrato marcado ("SLFIA") dado a conocer por Oellerich, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1984) 22:895-904; los inmunoensayos de donador enzimático combinado ("CEDIA") dados a conocer por Khanna, *et al.*, *Clin. Chem. Acta* (1989) 185:231-240; inmunoensayos de partículas marcadas homogéneos tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica potenciada por partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas ("PETIA"), etc.; y similares.

A modo de ejemplo de ensayos heterogéneos están el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas ("ELISA") comentado en Maggio, E.T. citado anteriormente; el radioinmunoensayo, dado a conocer en Yalow, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 39:1157 (1960), etcétera.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de membrana enzimática ("EMIA"); luminoinmunoensayos ("LIA"); etcétera. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensor que implican la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie de anticuerpo inmovilizado tras la unión de un antígeno o hapteno. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor semiconductor, ensayos de inmunosensor de transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométrico, ensayos de electrodo amperométrico y similares. Los reactivos anteriores también pueden emplearse en inmunoensayos de múltiples analitos en los que uno o más analitos de entactógenos pueden ser objeto de detección junto con uno o más otros analitos tales como otras drogas y similares. Tales sistemas de múltiples analitos se describen en la patente estadounidense n.º 5.135.836.

Los ensayos homogéneos y heterogéneos, particularmente inmunoensayos enzimáticos e inmunoensayos de polarización de fluorescencia, se llevan a cabo normalmente en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad del ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir desde el 0 hasta aproximadamente el 40 por ciento en volumen de un codisolvente. El pH para el medio estará habitualmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH será habitualmente un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específica, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como miembros del sistema de producción de señales, etcétera.

Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El tampón particular empleado no es crítico para esta invención, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro tampón. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en el método según la presente invención. Por ejemplo, además de tampones el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Frecuentemente, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tal como albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similares.

Pueden aplicarse uno o más periodos de incubación al medio a uno o más intervalos incluyendo cualquier intervalo entre adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio se incuba habitualmente a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de los diversos componentes de los reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y habitualmente temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. Las temperaturas de incubación oscilan normalmente entre aproximadamente 5º y aproximadamente 99ºC, habitualmente entre aproximadamente 15ºC y aproximadamente 70ºC, más habitualmente de 20ºC a aproximadamente 45ºC. El periodo de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 6 horas, habitualmente, desde aproximadamente 2 segundos hasta aproximadamente 1 hora, más habitualmente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos. El periodo de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos, que está determinada por la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación. Las temperaturas durante las mediciones oscilarán

generalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50°C, más habitualmente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40°C.

5 La concentración de analito de entactógeno que puede someterse a ensayo varía generalmente desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-17} M, más habitualmente desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-14} M. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (en relación con la cantidad de analito presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito determinarán normalmente las concentraciones de los diversos reactivos.

10 La concentración de analitos que va a detectarse variará generalmente desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-17} M, más habitualmente desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-14} M. En general, se establece un nivel de punto de corte predeterminado para cada analito que se sospecha que está en una muestra. El nivel de punto de corte predeterminado particular se determina generalmente para cada analito. Los expertos en la técnica son muy conscientes de los factores que se refieren a la selección de niveles de punto de corte predeterminados. Por ejemplo, para muchas drogas, los niveles de punto de corte se determinan por SAMSA, una agencia del Department of Health and Human Services. La naturaleza del sistema de producción de señales puede ser una consideración en la determinación de los niveles de punto de corte predeterminados de algunos analitos. Otra consideración es que la variación esperada en la concentración de los analitos que es significativa debe proporcionar una diferencia de señal medible de manera precisa.

20 Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinarán generalmente mediante el intervalo de concentración de interés del analito de entactógeno. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determinará empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo a lo largo del intervalo. Es decir, una variación en la concentración de analito de entactógeno que es significativa debe proporcionar una diferencia de señal medible de manera precisa. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema de producción de señales y la naturaleza de, y los niveles de punto de corte predeterminados para, los analitos de entactógenos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

30 Aunque el orden de adición puede variarse ampliamente, habrá determinadas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más sencillo es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, los reactivos pueden combinarse secuencialmente. Opcionalmente, puede añadirse una etapa de incubación posteriormente a cada adición, que oscila generalmente entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 6 horas, más habitualmente entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 hora.

35 Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y se pretende que describan la invención.

40 En un ensayo homogéneo, tras combinarse todos los reactivos, se determina la señal y se relaciona con la cantidad de analito de entactógeno en la muestra. Por ejemplo, en un ensayo de EMIT para detectar MDA, se combina una muestra que se sospecha que contiene MDA en un medio acuoso o bien simultáneamente o bien secuencialmente con un conjugado de MDA-enzima y anticuerpo que puede reconocer MDA y el conjugado, ambos de los cuales se preparan según la presente invención. Generalmente, se añade un sustrato para la enzima, lo que da como resultado la formación de un producto cromogénico o fluorogénico tras la reacción catalizada por enzima. Enzimas preferidas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina pero pueden emplearse otras enzimas. La MDA y el conjugado de MDA-enzima compiten por los sitios de unión en el anticuerpo. Entonces se determina la actividad enzimática en el medio, habitualmente por medios espectrofotométricos, y se compara con la actividad enzimática determinada cuando se someten a prueba calibradores o muestras de referencia en los que está presente una cantidad conocida de MDA. Normalmente, los calibradores se someten a prueba de una manera similar a las pruebas de la muestra que se sospecha que contiene MDA. Los calibradores contendrán normalmente concentraciones diferentes, pero conocidas, del analito de MDA que va a determinarse. Preferiblemente, los intervalos de concentración presentes en los calibradores abarcarán el intervalo de concentraciones de MDA sospechadas en las muestras desconocidas.

55 Los ensayos heterogéneos implican habitualmente una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se dan a conocer una variedad de formatos de ensayo competitivos y no competitivos en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un ensayo competitivo típico, se pone en contacto un soporte que tiene un anticuerpo para un analito de entactógeno tal como, por ejemplo, un anticuerpo para MDA, unido al mismo con un medio que contiene la muestra y un conjugado de MDA-marcador en el que se conjuga MDA con un marcador detectable tal como una enzima. Tras separar el soporte y el medio, se determina la actividad del marcador del soporte o el medio mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de MDA en la muestra.

65 El soporte puede estar compuesto por un material orgánico o inorgánico, sólido o fluido, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de varias formas, tales como partícula, incluyendo perla, película, membrana, tubo, pocillo, tira, varilla, placa y similares. Dependiendo del tipo de

ensayo, el soporte puede ser suspendible o no en el medio en el que se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc.; o bien usados en sí mismos o bien conjuntamente con otros materiales.

La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente, y puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, disponibles comúnmente en la bibliografía, tal como se comentó anteriormente. Véanse, por ejemplo, "Immobilized Enzymes", Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cautrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970). La superficie del soporte es habitualmente polifuncional o puede polifuncionalizarse o puede unirse a un miembro de sbp, o similares, a través de interacciones covalentes o específicas o no específicas no covalentes. Tal unión es indirecta cuando se usan interacciones no covalentes y es directa cuando se emplean interacciones covalentes. Están disponibles o pueden incorporarse una amplia variedad de grupos funcionales. Los grupos funcionales incluyen ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etileno, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. La manera de unión de una amplia variedad de compuestos a superficies se conoce bien y se ilustra ampliamente en la bibliografía (véase anteriormente).

La unión del anticuerpo para MDA y MDA da como resultado la formación de un complejo inmunitario que puede detectarse directa o indirectamente de numerosos modos que se conocen bien en la técnica. Los complejos inmunitarios se detectan directamente, por ejemplo, cuando los anticuerpos empleados están conjugados con un marcador. El complejo inmunitario se detecta indirectamente examinando para detectar el efecto de la formación de complejos inmunitarios en un medio de ensayo sobre un sistema de producción de señales o empleando un receptor marcado que se une específicamente a un anticuerpo producido empleando uno de los conjugados de inmunógenos de haptenos de la invención.

La activación del sistema de producción de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señales. Para los miembros de un sistema de producción de señales que se activan con luz, se irradia el miembro con luz. Para miembros de sistemas de producción de señales que están sobre la superficie de una partícula, la adición de una base puede dar como resultado la activación. Se sugerirán otros métodos de activación a los expertos en la técnica en vista de las descripciones en el presente documento. Para algunos sistemas de producción de señales no es necesario ningún agente para la activación, tales como los sistemas que implican un marcador que es un marcador radiactivo, una enzima, etcétera. Para sistemas enzimáticos, puede ser necesaria la adición de un sustrato y/o un cofactor.

En determinadas realizaciones, pueden emplearse marcadores primero y segundo y comprenden un par de marcadores. Estos pares de marcadores pueden ser, por ejemplo, un generador o sensibilizador de oxígeno singlete y un par de reactantes quimioluminiscentes, un par enzimático en el que un producto de la primera enzima sirve como sustrato para la segunda enzima y un par de donador y aceptor de energía luminiscente, por ejemplo, un donador o aceptor de energía y un compuesto fluorescente. La señal se iniciará habitualmente por, y/o se detectará como, radiación electromagnética y será preferiblemente luminiscencia tal como quimioluminiscencia, fluorescencia, electroluminiscencia o fosforescencia.

El examen para detectar la presencia y cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, instrumento fotográfico y similares. La presencia y cantidad de señal detectada se relaciona con la presencia y cantidad del analito de entactógeno presente en una muestra por encima del nivel de punto de corte predeterminado. Las temperaturas durante las mediciones oscilan generalmente entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 70°C, más habitualmente entre aproximadamente 20° y aproximadamente 45°C, más habitualmente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C. En un enfoque, se forman curvas patrón usando concentraciones conocidas de los analitos que van a examinarse. También pueden usarse calibradores y otros controles.

La descripción a continuación de determinadas realizaciones a modo de ejemplo de los métodos usa la expresión "y/o", que significa que el método puede implicar o no cada punto mencionado. Esta expresión se usa por motivos de brevedad. En general, un método implicará al menos un anticuerpo para un analito, por ejemplo, metilendioxianfetamina, y al menos un conjugado enzimático que se corresponde con ese analito, por ejemplo, un conjugado enzimático de una metilendioxianfetamina.

Una realización es un método para determinar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilanfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA), comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar en combinación en un medio:

- (i) una muestra que se sospecha que contiene dicho compuesto y
- (ii) un anticuerpo generado contra el entactógeno de un compuesto según la reivindicación 1

5 y

(b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicho compuesto y dicho anticuerpo, indicando la presencia del mismo la presencia de dicho compuesto en dicha muestra.

10 Una realización es un método para determinar anfetamina y/o metanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina, comprendiendo dicho método:

15 (a) proporcionar en combinación en un medio:

- (i) dicha muestra,
- (ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o
- 20 (iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- (v) un compuesto según la reivindicación 2

25 y

30 (b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia del mismo la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

35 El examen puede comprender medir la señal de la enzima, estando relacionada la cantidad de la misma con la presencia de la metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en la muestra. El método puede ser un método homogéneo y se examina el medio para determinar la cantidad de la señal. El método puede ser un método heterogéneo y se separa el complejo, si está presente, del medio y se examina el medio o el complejo para determinar la cantidad de la señal. La enzima puede ser glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

40 Una realización es un método para determinar metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina, comprendiendo dicho método:

45 (a) proporcionar en combinación en un medio:

- (i) dicha muestra,
- (ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o
- 50 (iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- (v) un compuesto según la reivindicación 5

55 y

60 (b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia del mismo la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioximetanfetamina en dicha muestra.

65 El examen puede comprender medir la señal de la enzima, estando relacionada la cantidad de la misma con la

presencia de la metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en la muestra. El método puede ser un método homogéneo y se examina el medio para determinar la cantidad de la señal. El método puede ser un método heterogéneo y se separa el complejo, si está presente, del medio y se examina el medio o el complejo para determinar la cantidad de la señal. La enzima puede ser glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Una realización es un método para determinar metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina, comprendiendo dicho método:

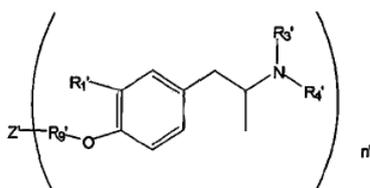
(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) dicha muestra,

(ii) un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxianfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioximetanfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxietanfetamina,

(iii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 3 y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto de fórmula:



en la que:

R^1 es H, o metilo o etilo, preferiblemente, H,

R^3 es H,

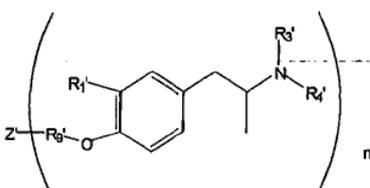
R^4 es metilo,

R^9 es $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^6$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^6)=CH_2$,

R^6 es Z' , que es una proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido),

n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido entre aproximadamente 500; y/o

(v) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto de fórmula:



en la que:

R^1 es H, o metilo o etilo, preferiblemente, H,

R^3 es H,

R^4 es etilo,

R^9 es $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^6$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^6)=CH_2$,

R^6 es Z' , que es una proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido),

n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido entre aproximadamente 500; y

(b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia del mismo la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

El examen puede comprender medir la señal de la enzima, estando relacionada la cantidad de la misma con la presencia de la metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en la muestra. El método puede ser un método homogéneo y se examina el medio para determinar la cantidad de la señal. El método puede ser un método heterogéneo y se separa el complejo, si está presente, del medio y se examina el medio o el complejo para determinar la cantidad de la señal. La enzima puede ser glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

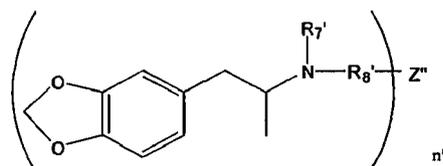
Otra realización es un método para determinar metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) dicha muestra,

(ii) un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxianfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioximetanfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxietanfetamina,

(iii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto de fórmula:



en la que:

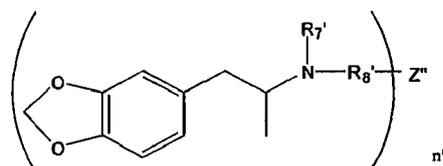
$R^{7'}$ es H,

$R^{8'}$ es $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^{5'}$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^{5'}$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^{5'}$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^{5'})=CH_2$, preferiblemente, $R^{8'}$ es $-C(O)(CH_2)_nR^{5'}$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^{5'}$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^{5'}$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^{5'})=CH_2$,

$R^{5'}$ es Z'' , que es una proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido),

n'' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido entre aproximadamente 500; y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto de fórmula:



en la que:

R^{7'} es metilo,

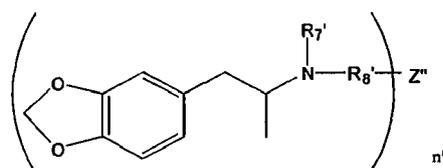
5 R^{8'} es -C(O)(CH₂)_nNHC(O)R^{5'}, -C(O)(CH₂)_nNHC(O)(CH₂)_nSR^{5'}, -(CH₂)_nSCH₂C(O)R^{5'} o
-(CH₂)_nC(SO₂R^{5'})=CH₂,

R^{5'} es Z'', que es una proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido),

10 n'' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador
inmunogénico dividido entre aproximadamente 500; y/o

(v) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno
de un compuesto de fórmula:

15



en la que:

20 R^{7'} es etilo,

R^{8'} es -C(O)(CH₂)_nNHC(O)R^{5'}, -C(O)(CH₂)_nNHC(O)(CH₂)_nSR^{5'}, -(CH₂)_nSCH₂C(O)R^{5'} o
-(CH₂)_nC(SO₂R^{5'})=CH₂,

25 R^{5'} es Z'', que es una proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido),

n'' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador
inmunogénico dividido entre aproximadamente 500; y

30 (b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha
metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha
metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha
metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia del mismo la
presencia de dicha anfetamina y/o metanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

35

El examen puede comprender medir la señal de la enzima, estando relacionada la cantidad de la misma con la
presencia de la metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en la muestra. El
método puede ser un método homogéneo y se examina el medio para determinar la cantidad de la señal. El método
puede ser un método heterogéneo y se separa el complejo, si está presente, del medio y se examina el medio o el
40 complejo para determinar la cantidad de la señal. La enzima puede ser glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Kits

Otro aspecto de la presente invención se refiere a kits útiles para realizar convenientemente un ensayo para la
determinación de un analito de entactógeno tal como, por ejemplo, 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-
45 metilendioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxietil-anfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina
(HMMA). El kit comprende (a) un anticuerpo generado contra un conjugado de un inmunógeno tal como, por
ejemplo, una proteína, y un compuesto de fórmula I, fórmula II o fórmula III y (b) reactivos auxiliares para determinar
el compuesto. El kit puede comprender además un conjugado de marcador del compuesto de fórmula I, fórmula II o
50 fórmula III anterior.

Para potenciar la versatilidad de la invención objeto, los reactivos del kit pueden proporcionarse en combinación
envasada, en los mismos recipientes o recipientes separados, en forma líquida o liofilizada de modo que la razón de
los reactivos proporciona una optimización sustancial del método y el ensayo. Los reactivos pueden estar cada uno
55 en recipientes separados o pueden combinarse diversos reactivos en uno o más recipientes dependiendo de la
reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos.

El kit puede incluir además otros reactivos envasados por separado para realizar un ensayo tales como miembros de
sbp adicionales, reactivos auxiliares tales como un sustrato enzimático auxiliar, etcétera. Las cantidades relativas de
60 los diversos reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos
que optimizan sustancialmente las reacciones que es necesario que se produzcan durante el presente método y

adicionalmente para optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos del kit pueden proporcionarse como un polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo según la presente invención. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método según la presente invención tal como se describió anteriormente.

La descripción a continuación de determinadas realizaciones a modo de ejemplo de kits usa la expresión "y/o", que significa que el kit puede contener o no cada punto mencionado. Esta expresión se usa por motivos de brevedad. En general, un kit incluirá al menos un anticuerpo para un analito, por ejemplo, metilendioxianfetamina, y al menos un conjugado enzimático que se corresponde con ese analito, por ejemplo, un conjugado enzimático de una metilendioxianfetamina.

Una realización particular es un kit que comprende en combinación envasada:

- (i) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o
- (ii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- (iv) un compuesto según la reivindicación 5.

Otra realización de un kit comprende en combinación envasada:

- (i) un anticuerpo para metilendioxianfetamina,
- (ii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- (iv) un compuesto según la reivindicación 3.

Otra realización de un kit comprende en combinación envasada:

- (i) un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxianfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioximetanfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxietanfetamina, y
- (ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 4, en el que R^7 es H, o un compuesto según la reivindicación 3, en el que R^1 es OH, R^3 es H y R^4 es H; y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 4, en el que R^7 es metilo, o un compuesto según la reivindicación 3, en el que R^1 es OH, R^3 es metilo y R^4 es H; y/o
- (iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 4, en el que R^7 es etilo, o un compuesto según la reivindicación 3, en el que R^1 es OH, R^3 es etilo y R^4 es H.

Ejemplos

La invención se demuestra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos ilustrativos. Las partes y los porcentajes mencionados en el presente documento son en peso a menos que se especifique lo contrario. Las temperaturas son en grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$).

La cromatografía en capa fina (CCF) analítica fue el método de análisis habitual y se realizó en placas con soporte de vidrio de gel de sílice GF de Analtech Uniplate (0,25 mm) usando el disolvente especificado. Se visualizaron los puntos en CCF mediante luz ultravioleta (onda corta y/o larga) y/o vapores de yodo. Se llevó a cabo cromatografía ultrarrápida en gel de sílice 60 A de Whatman (230-400 de malla). Se obtuvieron todos los productos químicos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO), Fluka (Milwaukee, WI) y se usaron tal como se recibieron. Se registraron de manera rutinaria espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN con un espectrómetro Bruker UltrashielTM-400 de (400 MHz) (Bruker, Billerica MA). Se notificó el desplazamiento químico en partes por millón (ppm, δ) y se refirió a tetrametilsilano o a disolvente deuterado como referencia interna. Las abreviaturas de RMN usadas son s (singlete), d (doblete) y m (multiplete). Se obtuvieron los espectros de masas en el Mass Spectrometry Laboratory, University of California en Berkeley, Berkeley, California.

Se determinaron los puntos de fusión en un aparato capilar de Hoover y no se corrigieron. Se registraron los espectros infrarrojos en un espectrómetro 2971R de Perkin-Elmer. Se realizaron los espectros de absorción UV-visible en un espectrofotómetro de red de diodos HP 8452A. Se realizaron las mediciones de fluorescencia en un espectrofotómetro Spex fluorolog o un espectrofotómetro 650-40 de Perkin Elmer.

Las siguientes abreviaturas tienen los significados expuestos a continuación:

- 5 g – gramos
- 10 mg – miligramos
- ml – mililitros
- 15 μ l – microlitros
- mmol – milimoles
- 20 DMF – dimetilformamida
- THF – tetrahidrofurano
- RMN – espectroscopía de resonancia magnética nuclear
- 25 MHz – megahercios
- EDAC – clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (Sigma Chemical Company)
- 30 MeOH – metanol
- FAB-EM – bombardeo por átomos rápidos – espectrometría de masas
- Agua DI – agua desionizada
- 35 Ensayo de concentración de proteína de BCA – Pierce Chemical Company
- TNBS – ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico
- 40 KLH – hemocianina de lapa californiana
- NHS – éster N-hidroxisuccinímico
- THF - tetrahidrofurano
- 45 tBoc₂O – dicarbonato de di-terc-butilo
- TFA – ácido trifluoroacético

Preparación de anticuerpos

50 Se empleó el siguiente método para preparar anticuerpos policlonales: Se obtiene antisuero que contiene anticuerpos mediante técnicas bien establecidas que implican inmunización de un animal, tal como un conejo, una cobaya o una cabra, con un inmunógeno apropiado y obtención de antisueros de la sangre del animal inmunizado tras un periodo de espera apropiado. Se proporcionan revisiones del estado de la técnica por Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., EE.UU., 1976), Butler, J. Immunol. Meth. 7: 1-24 (1975); Broughton y Strong, Clin. Chem. 22: 726-732 (1976); y Playfair, *et al.*, Br. Med. Bull. 30: 24-31 (1974).

60 Puede emplearse el siguiente procedimiento para preparar anticuerpos monoclonales: Se produjeron anticuerpos monoclonales según las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, Nature 265:495-497, 1975. Se encuentran revisiones de técnicas de anticuerpos monoclonales en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, *et al.* Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980), y Methods of Enzymology 73 (Parte B): 3-46 (1981). Se inyectan muestras de una preparación de inmunógeno apropiado en un animal tal como un ratón y, tras un tiempo suficiente, se sacrifica el animal y se obtienen células del bazo. Alternativamente, pueden sensibilizarse las células del bazo de un animal no inmunizado al inmunógeno *in vitro*. Pueden comprimirse los cromosomas de células del bazo que codifican para las secuencias de base para las inmunoglobulinas deseadas

fusionando las células del bazo, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol, con una línea celular de mieloma. Se deja que las células resultantes, que incluyen hibridomas fusionados, crezcan en un medio selectivo, tal como medio HAT, y se hacen crecer las células inmortalizadas supervivientes en tal medio usando condiciones de dilución limitante. Se hacen crecer las células en un recipiente adecuado, por ejemplo, pocillos de microtitulación, y se examina el sobrenadante para seleccionar anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada.

Existen diversas técnicas para potenciar los rendimientos de anticuerpos monoclonales, tales como inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped mamífero, que acepta las células, y recogida el líquido ascítico. Cuando se reúne una cantidad insuficiente del anticuerpo monoclonal en el líquido ascítico, se recoge el anticuerpo de la sangre del huésped. Alternativamente, puede hacerse crecer la célula que produce el anticuerpo deseado en un dispositivo de cultivo celular de fibras huecas o un dispositivo de frasco centrifugador, ambos de los cuales se conocen bien en la técnica. Existen diversas maneras convencionales para el aislamiento y la purificación de los anticuerpos monoclonales con respecto a otras proteínas y otros contaminantes (véase Köhler y Milstein, citado anteriormente).

En general, pueden purificarse anticuerpos mediante técnicas conocidas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía de DEAE, cromatografía de ABx y similares, filtración, etcétera.

20 Preparación del compuesto (7) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de MDMA (1) (45 mg) en DMF (10 ml) se le añadió NaH (27 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió bromoacetato de metilo (50 mg) a la mezcla. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. Se eliminó la DMF mediante evaporación rotatoria y se añadió agua (10 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 25 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (2/3) como eluyente dando el producto deseado (7) (48 mg, rendimiento del 92%); FAB-EM: MH⁺ (266); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,64 (m, 3H), 5,88 (s, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,28 (s, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,25 (m, 1 H), 0,91 (d, J=6,3 Hz, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 1,72,5, 149,9, 146,1, 134,2, 122,4, 109,9, 108,5, 101,2, 61,0, 55,3, 52,2, 39,8, 38,9, 14,7.

30 Preparación del compuesto (8) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de 7 (20 mg, 0,0754 mmol) en MeOH (5 ml) y H₂O (0,5 ml) se le añadió K₂CO₃ (104 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió HCl (6 N) para mantener el valor del pH a 3-4. Se eliminó la mayor parte del MeOH y H₂O mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando CH₂Cl₂/MeOH (17/3) como eluyente dando el producto deseado (8) (20 mg); FAB-EM: MH⁺ (252); ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ: 6,76 (m, 3H), 5,92 (s, 2H), 4,00 (m, 2H), 3,66 (m, 1 H), 3,23 (m, 1 H), 2,94 (s, 3H), 2,82 (m, 1H), 1,22 (d, J=6,6 Hz, 3H).

40 Preparación de inmunógeno de MDMA-KLH (10) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de 8 (8 mg, 0,0278 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadieron EDAC (18 mg, 0,0938 mmol) y NHS (14 mg, 0,121 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo argón durante 2,5 horas. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (gel de sílice, MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9). Se añadió el hapteno activado (9) gota a gota bajo argón a 6 ml de disolución de fosfato de sodio (0,1 M, pH = 8,0) de KLH (20 mg) a 0°C bajo argón. El valor del pH cambió durante la adición y se usó 0,1 N de disolución acuosa de NaOH para mantener el pH a 8,0. Tras completarse la adición, se permitió que la disolución se agitase a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se dializó el conjugado (10) frente a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (pH = 7,0, 3 litros) preparada a partir de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (tampón de Sigma, 400 ml) diluyendo con agua DI (2600 ml) a 4°C durante 4 horas. Se repitió el procedimiento de diálisis tres veces con disolución tampón reciente durante 16, 24 y 40 horas cada vez. Finalmente, se dializó el conjugado con disolución tampón fosfato de sodio (10 mM, pH = 7,0) dos veces (3 horas y 4 horas). Se midió la concentración de proteína usando el ensayo de concentración de proteína de BCA y se usó el método de TNBS para la determinación del número de haptenos. El inmunógeno (10) tiene una concentración de 2,32 mg/ml con un número de haptenos de 1087, y se usó para la inmunización de ratones para la producción de anticuerpos.

50 Preparación del compuesto (11) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de MDA (4) (30 mg, 0,139 mmol) en DMF (18 ml) se le añadió NaH (18 mg, 0,713 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió bromoacetato de metilo (32 mg, 0,209 mmol) a la mezcla. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. Se eliminó la DMF mediante evaporación rotatoria y se añadió agua (10 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 20 ml). Se secó la fase orgánica combinada sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (2/3) como eluyente dando el producto deseado (11) (23 mg, rendimiento del 66%); FAB-EM: MH⁺ (252); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,66 (m, 3H), 5,90 (s, 2H), 3,76 (m, 1H),

3,68 (s, 3H), 3,41 (m, 2H), 2,84 (m, 1H), 2,63 (m, 1H), 2,52 (m, 1H), 1,01 (d, $J=6,2$ Hz, 3H); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 173,3, 148,0, 146,4, 133,1, 122,6, 109,9, 108,6, 101,2, 54,6, 52,8, 52,2, 48,9, 43,8, 20,23.

Preparación del compuesto (12) que sólo es para fines de referencia

5 A una disolución de 11 (23 mg, 0,0951 mmol) en MeOH (12 ml) se le añadió NH_4OH (1 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó la mayor parte del MeOH y NH_4OH mediante evaporación rotatoria. Se secó adicionalmente el residuo a alto vacío para eliminar la cantidad traza de MeOH y NH_4OH . Se disolvió el residuo en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (3/1) como eluyente dando el producto deseado (12) (20,8 mg, rendimiento del 96%); FAB-EM: MH^+ (237); ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7,03 (m, 1 H), 6,68 (m, 3H), 5,92 (s, 2H), 5,70 (m, 1 H), 3,11 (m, 2H), 2,81 (m, 1H), 2,55 (m, 1H), 1,05 (d, $J=6,3$ Hz, 3H).

Preparación de inmunógeno de MDA-KLH (14) que sólo es para fines de referencia

15 A una disolución de 12 (8 mg, 0,0337 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadieron EDAC (19 mg, 0,0991 mmol) y NHS (19 mg, 0,165 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo argón durante 16 horas. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF (gel de sílice, $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1/9$). Se añadió el hapteno activado (13) gota a gota bajo argón a 5 ml de disolución de fosfato de sodio (0,1 M, pH = 8,0) de KLH (20 mg) a 0°C bajo argón. El valor del pH cambió durante la adición y se usó 0,1 N de disolución acuosa de NaOH para mantener el pH = 8,0. Tras completarse la adición, se permitió que el conjugado se agitase a temperatura ambiente durante 4 horas. Se dializó el conjugado (14) frente a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (pH = 7,0, 3 litros) preparada a partir de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (tampón de Sigma, 400 ml) diluyendo con agua DI (2600 ml) a 4°C durante 4 horas. Se repitió el procedimiento de diálisis con disolución tampón reciente durante 16, 24 y 40 horas. Finalmente, se dializó el conjugado con disolución tampón fosfato de sodio (10 mM, pH = 7,0) dos veces (3 horas y 4 horas). Se midió la concentración de proteína usando el ensayo de concentración de proteína de BCA y se usó el método de TNBS para la determinación del número de haptenos. El inmunógeno (14) tiene una concentración de 2,63 mg/ml con un número de haptenos de 1490, y se usó para la inmunización de ratones para la producción de anticuerpos.

Preparación del compuesto (15)

35 A una disolución con agitación de MDMA (1) (15,7 mg, 0,0684 mmol) en THF (8 ml) se le añadió diisopropiletilamina (100 μl , 0,574 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadió N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (48 mg, 0,202 mmol) a la mezcla de reacción bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (10 ml) y se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria. Se extrajo la fase acuosa con CH_2Cl_2 (3 x 25 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (10 ml) y se secaron sobre MgSO_4 . Se filtró la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (3/7) como eluyente dando el producto deseado (15) (16 mg, rendimiento del 75%); FAB-EM: MH^+ (314); ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6,62 (m, 3H), 5,93-5,89 (m, 2H), 4,86, 3,45 (m, 1H), 3,98 (m, 1 H), 3,71 (m, 1 H), 3,49 (m, 1 H), 2,86 (s, 3H), 2,68 (m, 2H), 1,28, 1,11 (m, 3H).

Preparación del compuesto (16)

45 A una disolución con agitación de MDMA (1) (16 mg, 0,0697 mmol) en THF (10 ml) se le añadió diisopropiletilamina (100 μl , 0,574 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadió éster N-hidroxisuccínico de bromoacetilglicina (61 mg, 0,208 mmol) a la mezcla de reacción bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (10 ml) y se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria. Se extrajo la fase acuosa con CH_2Cl_2 (3 x 25 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con agua (10 ml) y se secó sobre MgSO_4 . Se filtró la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (3/7) como eluyente dando el producto deseado (16) (15 mg, rendimiento del 58%); FAB-EM: MH^+ (371); ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7,60 (m, NH), 6,69 (m, 3H), 5,91 (s, 2H), 4,86 (m, 1H, NH), 4,05-3,82 (m, 4H), 3,50 (m, 1 H), 2,88, 2,76 (s, 3H), 2,69 (m, 2H), 1,24-1,12 (d, 3H).

Preparación del compuesto (17)

60 A una disolución con agitación de MDMA (1) (20,9 mg, 0,091 mmol) en THF (5 ml) se le añadió NaH (12 mg, 0,475 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió 1,3-dibromo-2-(metilsulfonil)propano (31 mg, 0,11 mmol) a la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 40 minutos. Un análisis de CCF de la mezcla mostró que el material de partida MDMA había desaparecido, y presentó un nuevo punto menos polar. Se añadió agua (0,1 ml) y se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/1) como eluyente dando el producto deseado (17) (26 mg, rendimiento

del 92%); FAB-EM: MH^+ (312); 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6,64 (m, 3H), 6,27 (s, 1 H), 5,90 (s, 2H), 5,82 (s, 1 H), 3,42 (m, 2H), 3,01 (m, 1 H), 2,80 (s, 3H), 2,74 (m, 1H), 2,45 (m, 1 H), 2,17 (s, 3H), 0,96 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 148,3, 148,0, 146,2, 134,2, 127,6, 122,3, 109,8, 108,5, 101,2, 61,1, 55,3, 43,5, 39,7, 35,1, 14,00.

5

Preparación del compuesto (18)

A una disolución con agitación de MDA (4) (19 mg, 0,0881 mmol) en THF (10 ml) se le añadió diisopropiletamina (120 μ l, 0,689 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadió N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (62,5 mg, 0,2637 mmol) a la mezcla de reacción bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (10 ml) y se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria. Se extrajo la fase acuosa con CH_2Cl_2 (3 x 30 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (10 ml) y se secaron sobre $MgSO_4$. Se filtró la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (2/3) como eluyente dando el producto deseado (18) (25 mg, rendimiento del 95%); FAB-EM: MH^+ (300); 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6,67 (m, 3H), 6,30 (m, 1H), 5,92 (s, 2H), 4,15 (m, 1 H), 3,81 (s, 2H), 2,73 (m, 1 H), 2,66 (m, 1 H), 1,13 (d, $J=6,6$ Hz, 3H).

20

Preparación del compuesto (19)

A una disolución con agitación de MDA (4) (10 mg, 0,04636 mmol) en THF (5 ml) se le añadió diisopropiletamina (41 μ l, 0,235 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió éster N-hidroxisuccínico de bromoacetilglicina (40,7 mg, 0,138 mmol) a la mezcla de reacción bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (5 ml) y se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria. Se extrajo la fase acuosa con CH_2Cl_2 (3 x 20 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (10 ml) y se secaron sobre $MgSO_4$. Se filtró la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/1) como eluyente dando el producto deseado (19) (8 mg, rendimiento del 48,3%); FAB-EM: MH^+ (357, 359); 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7,60 (m, NH), 6,64 (m, 3H), 6,00 (m, NH), 5,92 (s, 2H), 4,15 (m, 1H), 4,05 (m, 1 H), 3,88 (s. a., 3H), 2,69 (m, 2H), 1,12 (d, $J=6,6$ Hz, 3H).

30

Preparación del compuesto (20)

A una disolución con agitación de MDA (4) (10 mg, 0,04636 mmol) en THF (5 ml) se le añadió NaH (5 mg, 0,198 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió 1,3-dibromo-2-(metilsulfonyl)propano (14 mg, 0,05 mmol) a la mezcla de reacción a $-20^\circ C$. Se agitó la mezcla de reacción a $-20^\circ C$ durante 120 minutos. Se añadió agua (0,1 ml) y se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (7/3) como eluyente dando el producto deseado (20) (11 mg, rendimiento del 80%); FAB-EM: MH^+ (298); 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6,72 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H), 6,64 (s, 1 H), 6,60 (m 1H), 6,25 (s, 1H), 5,90 (s, 2H), 5,84 (s, 1 H), 3,62 (dd, $J = 21,3, 15,0$ Hz, 2H), 2,94 (s, 3H), 2,86 (m, 1 H), 2,58 (m, 2H), 1,06 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H); ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 149,4, 148,1, 146,5, 133,1, 126,1, 122,6, 109,9, 108,6, 101,3, 54,4, 46,9, 43,7, 43,3, 20,5.

Preparación del compuesto (24) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de clorhidrato de metilamina (4,1 g, 60,72 mmol) en MeOH (50 ml) se le añadió Na_2CO_3 (6,2 g, 58,5 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se filtró la mezcla de reacción en un matraz de fondo redondo de 100 ml que contenía 4-hidroxi-3-metil-fenil-acetona (22) (1,8 g, 10 mmol). Se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 2 horas y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se añadió cianoborohidruro de sodio (628 mg, 10 mmol) a la mezcla. Se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 5 horas y durante este tiempo se mantuvo el pH de la disolución en la neutralidad mediante adición de HCl 4 M en dioxano. Se evaporó el disolvente orgánico hasta sequedad mediante evaporación rotatoria y se disolvió el residuo en 20 ml de agua. Se acidificó la disolución con HCl 6 N hasta pH = 2-3, se extrajo con acetato de etilo, después se basificó hasta pH = 9-10 con NaOH 6 N, saturado con NaCl. Se extrajo la mezcla con acetato de etilo, se secaron los extractos orgánicos combinados sobre $MgSO_4$ anhidro y se filtraron. Se eliminó el acetato de etilo mediante evaporación dando un aceite. Se purificó el residuo oleoso mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando MeOH/ CH_2Cl_2 (1/4) como eluyente dando el producto deseado (24) (532 mg, rendimiento del 27%); 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6,82 (d, $J = 7,9$ Hz, 1 H), 6,67 (s, 1 H), 6,65 (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H), 4,82 (s, OH), 3,85 (s, 3H), 3,46 (s, 3H), 2,75 (m, 1 H), 2,587(m, 2H), 1,06 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H).

60

Preparación del compuesto (25) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de 24 (513 mg, 2,627 mmol) en THF (30 ml) y H_2O (20 ml) se le añadieron $tBoc_2O$ (1,21 g, 5,25 mmol) y K_2CO_3 (1,09 g, 7,89 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió

65

agua (20 ml) y se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 40 ml). Se lavó el disolvente orgánico combinado con agua (30 ml) y se secó sobre MgSO₄. Se filtró el disolvente y se concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (1/4) como eluyente dando el producto deseado (25) (632 mg, 82%); FAB-EM: MH⁺ (296); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,80-6,52 (m, 3H), 5,96 (m, 1H, OH), 4,48, 4,19 (s, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,68-2,50 (m, 5H), 1,48-1,46(m, 9H), 1,07-1,04 (m, 3H).

Preparación del compuesto (26) que sólo es para fines de referencia

10 A una disolución de 25 (100 mg, 0,3385 mmol) en DMF (10 ml) se le añadió NaH (77 mg, 3,05 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió bromoacetato de metilo (73 mg, 0,474 mmol) a la mezcla. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 65 horas. Se eliminó la DMF mediante evaporación rotatoria y se añadió agua (10 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 30 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (15 ml) y se secaron sobre MgSO₄. Se filtró la fase orgánica y se concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (3/7) como eluyente dando el producto deseado (26) (38 mg, rendimiento del 31%); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,73 (m, 3H), 4,65 (s, 2H), 4,51, 4,24 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 2,79-2,55 (m, 5H), 1,38-1,32 (m, 9H), 1,13 (s.a., 3H).

20 Preparación del compuesto (27) que sólo es para fines de referencia

25 A una disolución de 26 (19 mg, 0,0517 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se le añadió TFA (0,3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 120 minutos. Un análisis de CCF de la reacción mostró que el material de partida (26) había desaparecido y presentó un nuevo punto polar (gel de sílice, acetato de etilo/hexano = 2/3). Se eliminó la mayor parte del CH₂Cl₂ y TFA mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se puso el residuo a alto vacío para eliminar la cantidad traza de TFA. Esto dio el producto deseado (27) (19 mg, rendimiento del 96%); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7,54 (s.a., NH), 6,72 (m, 3H), 4,66 (s, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,40 (m, 1 H), 3,03 (1 H), 2,79 (m, 1 H), 2,72 (s.a., 3H), 1,32 (d, J = 6,4 Hz, 3H).

30 Preparación del compuesto (28) que sólo es para fines de referencia

35 A una disolución de 27 (18 mg, 0,0472 mmol) en MeOH (5 ml) y agua (1 ml) se le añadió K₂CO₃ (33 mg, 0,239 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 180 minutos. Se añadió HCl 1 N para ajustar los valores del pH a 2-3. Se eliminó la mayor parte del MeOH, HCl y agua mediante evaporación rotatoria a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando MeOH/CH₂Cl₂/AcOH (2/8/0,1) dando el producto deseado (28) (12 mg, rendimiento del 88%); ¹H-RMN (D₂O, 400 MHz) δ: 6,77 (m, 3H), 4,58 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,38 (m, 1 H), 2,87 (m, 1 H), 2,71 (m, 1H), 2,57 (s, 3H), 1,13 (d, J = 6,5 Hz, 3H).

40 Preparación de inmunógeno de HMMA (30) que sólo es para fines de referencia

45 A una disolución de 28 (10 mg, 0,0345 mmol) en DMF (0,6 ml) se le añadieron EDAC (20 mg, 0,1043 mmol) y NHS (19 mg, 0,165 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo argón durante 2,5 horas. Se añadió el hapteno activado (29) gota a gota bajo argón a 6 ml de disolución de fosfato de sodio (0,1 M, pH = 8,0) de KLH (20 mg) a 0°C bajo argón. El valor del pH cambió durante la adición y se usó 0,1 N de disolución acuosa de NaOH para mantener el pH a 8,0. Tras completarse la adición, se permitió que el conjugado se agitase a 4°C durante 16 horas. Se dializó el conjugado frente a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (pH = 7,0, 3 litros) preparada a partir de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (tampón de Sigma, 400 ml) diluyendo con agua DI (2600 ml) a 4°C durante 4 horas. Se repitió el procedimiento de diálisis con disolución tampón reciente durante 16, 24 y 40 horas. Finalmente, se dializó el conjugado con disolución tampón fosfato de sodio (10 mM, pH = 7,0) dos veces (3 horas y 4 horas). Se midió la concentración de proteína usando el ensayo de concentración de proteína de BCA y se usó el método de TNBS para la determinación del número de haptenos. El inmunógeno (30) tiene una concentración de 2,12 mg/ml con un número de haptenos de 1436, y se usó para la inmunización de ratas para la producción de anticuerpos.

55 Preparación del compuesto (31)

60 A una disolución de 25 (86 mg, 0,291 mmol) en tolueno (15 ml) se le añadieron K₂CO₃ (200 mg) y dibromoetano (2 ml). Se sometió la reacción a reflujo durante 48 horas y se agitó a temperatura ambiente durante 66 horas. Se añadió agua (10 ml) y se separó el tolueno. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 30 ml). Se lavó el disolvente orgánico combinado con agua (20 ml) y se secó sobre MgSO₄. Se filtró el disolvente y se concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (1/4) como eluyente dando el producto deseado (31) (62 mg, 53%); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,78 (m, 3H), 4,26 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,60 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,67 (m, 5H), 1,36 (m, 9H), 1,11 (s.a., 3H).

65

Preparación del compuesto (32)

A una disolución de 31 (61 mg, 0,1516 mmol) en etanol al 95% (10 ml) se le añadió tioacetato de potasio (100 mg, 0,8756 mmol). Se agitó la reacción a 55°C bajo argón durante 3 horas. Se eliminó la mayor parte del etanol mediante evaporación rotatoria. Se redisolvió el residuo en 5 ml de CH₂Cl₂ y se separó el precipitado por filtración y se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 10 ml). Se concentró el disolvente orgánico combinado hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (3/7) como eluyente dando el producto deseado (32) (50 mg, 83%); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,82 (m, 1 H), 6,64 (m, 2H), 4,08 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,25 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,65 (m, 5H), 2,33 (s, 3H), 1,33 (m, 9H), 1,10 (s.a., 3H).

Preparación del compuesto (33)

A una disolución de 32 (48 mg, 0,1207 mmol) en CH₂Cl₂ (3 ml) se le añadió TFA (0,4 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Un análisis de CCF de la mezcla mostró que el material de partida 22 había desaparecido y presentó un nuevo punto en la línea base (gel de sílice, acetato de etilo/hexano = 1/1). Se eliminó la mayor parte del CH₂Cl₂ y TFA mediante evaporación rotatoria. Se puso el residuo a alto vacío para eliminar trazas de TFA. Esto dio el producto deseado, (33) (49 mg, 98%); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,86 (m, 1H), 6,68 (m, 2H), 4,09 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,37 (m, 1 H), 3,26 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 3,07 (m, 1 H), 2,70 (m, 4H), 2,34 (s, 3H), 1,28 (d, J = 6,4 Hz, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 196,3, 150,3, 147,6, 128,8, 121,8, 117,5, 114,5, 113,3, 68,0, 57,7, 56,4, 39,6, 30,9, 28,6, 15,8.

Preparación de bromoacetil-KLH (35)

A una disolución de éster de NHS de ácido bromoacético (8,6 mg, 0,0364 mmol) en DMF (0,3 ml) se le añadió una disolución de KLH (40 mg) en tampón de NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,00, 0,1 M, 4 ml) a 4°C. Se agitó la mezcla de reacción en la cámara frigorífica (4°C) durante 16 horas. Se sometió la mezcla a cromatografía en una columna empacutada Sephadex G-50, eluyendo con tampón de NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,00, 0,1 M) con una velocidad de flujo de 20 ml/hora. Se monitorizaron las fracciones eluidas (4 ml de volumen para cada fracción) de la columna mediante UV a 280 nm. Se combinaron las fracciones n.º 10-13 dando 12 ml de bromoacetil-KLH (35). Se midió la concentración de proteína mediante un método de UV y se usó el método de TNBS para la determinación del número de haptenos. El conjugado tiene una concentración de 3,28 mg/ml con un número de haptenos de 925.

Preparación de inmunógeno de HMMA (36)

A una disolución de 33 (25 mg, 0,06 mmol) en MeOH (0,5 ml) y agua (0,1 ml) se le añadió K₂CO₃ (20 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo argón durante 1,5 horas. Un análisis de CCF de la mezcla mostró que un nuevo punto que estaba presente era el producto (34). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,84 (m, 1H), 6,68 (m, 2H), 4,26 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,11 (m, 2H), 3,07 (m, 1H), 2,73 (m, 1 H), 2,58 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 1,05 (d, J = 6,2 Hz, 3H).

A una disolución de bromoacetil-KLH bien preparado (35) (8 ml, 3,28 mg/ml, pH = 8,00) se le añadió lentamente la mezcla de reacción anterior a 4°C bajo argón. Se agitó la reacción a 4°C durante 16 horas. Se sometió la mezcla de reacción a cromatografía en una columna Sephadex G-50, que se equilibró con tampón de NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,20, 0,1 M, 200 ml). Se eluyó la columna con tampón de NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,20, 0,1 M) con una velocidad de flujo de 20 ml/hora. Se monitorizaron las fracciones eluidas (4 ml de volumen para cada fracción) de la columna mediante UV a 280 nm. Se recogieron las fracciones n.º 10-14 para tener 20 ml de inmunógeno (36). Se midió la concentración de inmunógeno usando el ensayo de concentración de proteína de BCA. El inmunógeno (36) tiene una concentración de 2,41 mg/ml con un número de haptenos de 925, y se usó para la inmunización de ratones para la producción de anticuerpos.

Preparación del compuesto (37)

A una disolución de 25 (32 mg, 0,108 mmol) en THF (12 ml) se le añadió NaH (19 mg, 0,752 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió 1,3-dibromo-2-(metilsulfonil)propano (43,8 mg, 0,156 mmol) a la mezcla de reacción, que se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua (0,1 ml) y se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/2) como eluyente dando el producto deseado (37) (38 mg, rendimiento del 85,2%); FAB-EM: MH⁺ (420); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,82 (m, 1 H), 6,70 (m, 2H), 6,45, 6,36 (s, 1 H), 6,16, 6,03 (s, 1 H), 4,85 (s, 2H), 3,90 (m, 1 H), 3,82 (s, 3H), 3,14 (s, 3H), 2,70 (m, 5H), 1,32 (m, 9H), 1,11 (s.a., 3H).

Preparación del compuesto (38)

A una disolución de 37 (19 mg, 0,046 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se le añadió TFA (0,3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 120 minutos. Un análisis de CCF de la reacción mostró que el material de

partida (26) había desaparecido y presentó un nuevo punto polar (gel de sílice, acetato de etilo/hexano = 1/2). Se eliminó la mayor parte del CH_2Cl_2 y TFA mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se secó adicionalmente el residuo a alto vacío para eliminar trazas de TFA. Esto dio el producto deseado (38) (19 mg, rendimiento del 96%); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6,84 (m, 1H), 6,70 (m, 2H), 6,49 (s, 1 H), 6,19 (s, 1 H), 4,84 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,40 (m, 1 H), 3,16 (s, 3H), 3,02 (m, 1 H), 2,72 (m, 4H), 1,32 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H).

Preparación del compuesto (39) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de 25 (200 mg, 0,677 mmol) en DMF (15 ml) se le añadió K_2CO_3 (280 mg, 2,03 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió bromoacetronitrilo (812 mg, 6,77 mmol) a la mezcla de reacción. Se calentó la mezcla de reacción a 80°C durante 18 horas. Se eliminó la mayor parte de la DMF mediante evaporación rotatoria a presión reducida y se añadió agua (20 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 40 ml). Se lavó el disolvente orgánico combinado con agua (20 ml) y se secó sobre MgSO_4 . Se filtró el disolvente y se concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/3) como eluyente dando el producto deseado (39) (204 mg, rendimiento del 90%); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6,76 (m, 3H), 4,74 (s, 2H), 4,26 (m, 1 H), 3,82 (s, 3H), 2,67 (m, 5H), 1,35 (m, 9H), 1,11 (m, 3H).

Preparación del compuesto (40) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de 39 (50 mg, 0,15 mmol) en MeOH (8 ml) se le añadió $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (85 mg, 0,363 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió NaBH_4 (58 mg, 1,53 mmol) a la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas y entonces se filtró. Se lavó el precipitado negro formado a partir de la reacción con CH_2Cl_2 (3 x 10 ml). Se concentraron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando MeOH/ CH_2Cl_2 (1/4) como eluyente dando el producto deseado (40) (11 mg) con recuperación de material de partida 39. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6,78 (m, 3H), 5,28 (m, NH), 4,51, 4,24 (m, 1 H), 4,00 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,07 (m, 2H), 2,69 (m, 5H), 1,35 (m, 9H), 1,12 (m, 3H).

Preparación del compuesto (50) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de MDMA (50 mg, 0,2177 mmol) en DMF (8 ml) se le añadieron NaH (30,7 mg, 1,21 mmol) y 5-bromovalerato de etilo (0,103 ml, 0,653 mmol). Se agitó la mezcla de reacción y se calentó a 90°C durante 17 horas. Se eliminó la DMF mediante evaporación rotatoria y se añadió agua (10 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 25 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con agua (4 x 10 ml) y se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante una CCF preparativa usando acetato de etilo/hexano (1/1) como disolvente de desarrollo en primer lugar y MeOH/ CH_2Cl_2 (1/9) dando el producto deseado (50) (36,5 mg, rendimiento del 52%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6,74 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,62 (d, $J = 7,9$ Hz, 1 H), 5,94 (s, 2H), 4,15 (q, $J = 7,13$ Hz, 2H), 2,90 (m, 2H), 2,48 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,37-2,31 (m, 3H), 2,30 (s, 3H), 1,64 (m, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,28 (t, $J = 7,13$ Hz, 3H), 0,94 (d, $J = 6,4$, 3H).

Preparación del compuesto (51) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de 50 (36,5 mg, 0,1137 mmol) en MeOH (5,0 ml) y H_2O (0,5 ml) se le añadió K_2CO_3 (159 mg, 1,15 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió HCl (6 N) a la mezcla para ajustar el pH = 3-4. Se evaporaron el MeOH y agua mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se disolvió el residuo en MeOH/ CH_2Cl_2 (2/8) y se filtró el K_2CO_3 . Se eliminó el disolvente orgánico mediante evaporación rotatoria y se puso el residuo a alto vacío dando el producto deseado (51) (35,9 mg, rendimiento del 96%). $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD 400 MHz) δ : 6,73 (m, 3H), 5,90 (s, 2H), 3,58 (m, 1H), 3,14 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 3,06 (m, 1 H), 2,80 (s, 3H), 2,69 (m, 1 H), 2,30 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 1,74 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,18 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

Preparación de inmunógeno de MDMA-C5-KLH (52) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de 51 (35,9 mg, 0,109 mmol) en THF (1,5 ml) se le añadieron DCC (26,9 mg, 0,13 mmol) y NHS (14 mg, 0,12 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se separó por filtración el precipitado de la reacción y se eliminó el THF mediante evaporación rotatoria. Se disolvió el hapteno activado en DMF (1 ml).

A una disolución de KLH (20 mg, 8 ml, pH = 8,00) se le añadió lentamente la disolución de hapteno activado anterior a 4°C bajo nitrógeno. Se mantuvo el valor de pH a 8,0. Se agitó la reacción a 4°C (cámara frigorífica) durante 16 horas. Se separó la mezcla de reacción en la columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón de NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 7,0, 0,1 M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación clara entre el inmunógeno de KLH y el hapteno. Se combinaron las fracciones que contenían proteína y se concentraron hasta 9 ml. Se midió la concentración de inmunógeno usando el ensayo de concentración de proteína de BCA. El inmunógeno (52) tenía una concentración de 1,89 mg/ml con un número de haptenos de 1108, y

se usó para la inmunización de ovejas, ratones y conejos para la producción de anticuerpos. Se preparó el inmunógeno (53) de una manera similar a la descrita anteriormente para el inmunógeno (52).

Preparación de hapteno de MDA (55) (figura 11) que sólo es para fines de referencia

A una disolución de MDA (4) (21,0 mg, 0,097 mmol) en THF (4 ml) se le añadió N,N-diisopropil-etil-amina (85 μ l, 0,49 mmol). Se agitó la mezcla durante media hora bajo nitrógeno antes de añadir éster de NHS de ácido β -maleimidopropiónico (54) (38,9 mg, 0,146 mmol). Se ejecutó la reacción bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante una hora y cuarenta minutos. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF con acetato de etilo como disolvente de desarrollo.

Se eliminó la mayor parte del disolvente orgánico mediante evaporador rotatorio. Se eliminó la cantidad traza de disolvente a alto vacío durante una hora. Se purificó el producto bruto (92,4 mg) mediante cromatografía en columna ultrarrápida con MeOH/CH₂Cl₂ (2/98) como eluyente dando un sólido blanco (55) (21,5 mg, rendimiento del 66%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6,66 (m, 5H), 5,93 (s, 2H), 5,45 (d, J= 8 Hz, 1 H), 4,16 (m, 1 H), 3,81 (t, J=8, 2H), 2,67 (m, 2H), 2,47 (t, J=8, 2H), 1,08 (d, J=4,0 Hz, 3H).

Se usaron los inmunógenos 10, 14, 30 y 36 para preparar anticuerpos según métodos similares a los descritos en el presente documento.

Preparación de conjugado con G6PDH mutante a partir de hapteno de MDA (19)

Haciendo referencia a la figura 10, se incubó una mezcla que contenía 5,5 ml de G6PDH mutante, que contenía 27,5 mg de proteína, en fosfato 50 mM – EDTA 1,0 mM, pH 7,25 y 55 μ l de una disolución de ditiotreitolo 0,5 M en tampón fosfato-EDTA a 2-8°C durante 16 horas. Se sometió la mezcla de proteína a intercambio de tampón con fosfato 50 mM – EDTA 1,0 mM – DTT 25 μ M, pH 7,25 en un sistema de ultrafiltración de Amicon equipado con una membrana YM10. Se continuó el intercambio de tampón hasta que una mezcla de 1,0 ml del efluente y 20 μ l de una ditiopiridina (DTDP; 11,4 mg/10 ml de alcohol al 10%) mostró una absorción a 324 nm idéntica a la de la mezcla de la disolución de DTDP con 1,0 ml del tampón fosfato-EDTA-DTT. Se cuantificó el número de sulfhidrilos presentes en una alícuota de la proteína mediante reacción con DTDP y se encontró que era de 1,0 \pm 0,5. Se añadieron 0,2 ml de una disolución de dimetilformamida que contenía 7,0 mg de hapteno (19) a 4 ml de la disolución de proteína que contenía 12 mg de proteína. Se agitó la mezcla de reacción ligeramente turbia a 2-8°C durante 16 h. Se separó el hapteno libre del conjugado de hapteno-enzima mediante pase a través de una columna Sephadex G-50, preparada y eluida con fosfato 50 mM, pH 7,0. Se combinaron las fracciones del conjugado que contenían proteína basándose en la absorción a 280 nm y se almacenaron a 2-8°C.

Se conjugaron los haptenos (15), (16), (17), (18), (20) y (38) con G6PDH usando un procedimiento de conjugación similar al descrito anteriormente.

Preparación de conjugado con G6PDH del compuesto 34

A una disolución de 34 (16,7 mg, 0,0565 mmol) en metanol (1 ml) se le añadieron K₂CO₃ (20 mg) y agua (50 μ l) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 hora. Se evaporó el metanol hasta sequedad y se disolvió el compuesto en DMF (0,2 ml). A esta disolución se le añadieron bromoacetil-G6PDH (1,5 ml, 7,2 mg/ml, 10,8 mg de proteína) y 0,62 ml de fosfato 100 mM – EDTA 5,0 mM, pH 7,60. Se ajustó el pH de 7,41 a 7,70. Se agitó la mezcla a 4°C durante 16 horas. Se centrifugó la mezcla y se filtró. Se diluyó la disolución con fosfato 50 mM y NaCl 100 mM, pH = 7,0. Se sometió la mezcla de proteína a intercambio de tampón con fosfato 50 mM – NaCl 100 mM, pH 7,0 en un sistema de ultrafiltración de Amicon equipado con una membrana YM10 hasta que se observó una reacción negativa de DTDP. Esto dio 3 ml de conjugado con G6PDH del compuesto 34.

Preparación de conjugado con G6PDH a partir del compuesto 8 (figura 12) que sólo es para fines de referencia

Se agitó una mezcla de 8 (22,15 mg, 0,077 mmol) y trietilamina (32,1 μ l, 0,23 mmol) en dioxano (1 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se enfrió la reacción en un baño de agua. Se añadió cloroformiato de isobutilo (15,7 μ l, 0,115 mmol) a la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadieron 0,23 ml de disolución de la reacción anterior (0,0177 mmol, hapteno activado) a una disolución de G6PDH (2 mg/ml, 9,5 ml) en fosfato 100 mM, pH 7,0. Se agitó la mezcla a 4°C durante 16 horas. Se sometió la mezcla de proteína a intercambio de tampón con fosfato 50 mM, pH 7,0 en un sistema de ultrafiltración de Amicon equipado con una membrana YM10. Esto dio 2 ml de conjugado con G6PDH (7,6 mg/ml, 15,2 mg de proteína).

Preparación de conjugado con G6PDH a partir del compuesto 51 (figura 13) que sólo es para fines de referencia

Se agitó una mezcla de 51 (20,6 mg, 0,0626 mmol) y trietilamina (26,0 μ l, 0,186 mmol) en dioxano (1 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se enfrió la reacción en un baño de agua. Se añadió cloroformiato de isobutilo (12,8 μ l, 0,0941 mmol) a la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se

añadieron 0,3 ml de disolución de la reacción anterior (0,0175 mmol, hapteno activado) a una disolución de G6PDH (2 mg/ml, 9,5 ml) en fosfato 100 mM, pH 7,0. Se agitó la mezcla a 4°C durante 16 horas. Se sometió la mezcla de proteína a intercambio de tampón con fosfato 50 mM, pH 7,0 en un sistema de ultrafiltración de Amicon equipado con una membrana YM10. Esto dio 2 ml de conjugado con G6PDH (9,06 mg/ml, 18,1 mg de proteína).

5 Preparación de conjugados con G6PDH a partir de los haptenos 15 que sólo es para fines de referencia, 16, 17, 19 y 20

10 Se prepararon conjugados con G6PDH a partir de los haptenos 15, 16, 17, 19 y 20 de una manera similar a la descrita anteriormente.

Ensayo usando reactivos según las realizaciones de la presente invención

15 Los anticuerpos y conjugados enzimáticos según la invención pueden emplearse en ensayos para la detección de los analitos respectivos. Se inyecta el inmunógeno (52) en ovejas para generar anticuerpo. Se realizan adiciones conocidas del anticuerpo obtenido del sangrado de ovejas en el diluyente de anticuerpo para preparar el reactivo de anticuerpo. El reactivo de anticuerpo consiste en anticuerpo tal como se preparó anteriormente, tampón, estabilizadores, conservantes y los sustratos para el conjugado enzimático NAD y glucosa-6-fosfato.

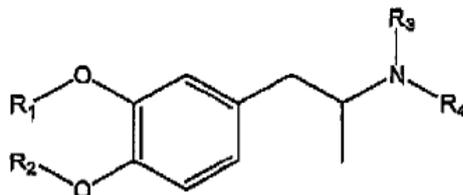
20 Se realizan adiciones conocidas del conjugado enzimático que comprende compuesto (19) y G6PDH en el reactivo de conjugado para preparar el reactivo de conjugado enzimático. El reactivo de conjugado enzimático consiste en el conjugado, tampón, estabilizadores y conservantes.

25 Se usan el reactivo de anticuerpo y el reactivo de conjugado enzimático en un formato de ensayo homogéneo para detectar éxtasis en muestras de orina. El analizador (instrumento) usado para configurar el ensayo es un analizador bioquímico Syva 30-R (Syva Company, Cupertino CA). Se incuba la muestra de orina que contiene éxtasis con reactivo de anticuerpo seguido por la adición del reactivo de conjugado enzimático. La actividad del conjugado enzimático disminuye tras la unión al anticuerpo. El conjugado enzimático, que no está unido al anticuerpo, cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato (G6P). La oxidación de G6P está vinculada con la reducción de NAD⁺ para dar NADH, lo que puede medirse a 340 nm. El cambio en la absorbancia a 340 nm puede medirse de manera espectrofotométrica. La concentración de éxtasis en una muestra de orina puede medirse en cuanto a la actividad de G6PDH. El aumento de la tasa a 340 nm se debe a la formación de NADH y es proporcional a la actividad del conjugado enzimático. Se genera una curva de ensayo usando adiciones conocidas de MDMA en orina negativa. La tasa de ensayo aumenta con el aumento de la concentración de droga libre en la muestra. Los resultados se resumen en las figuras 14 y 15.

35 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, a los expertos habituales en la técnica les resultará fácilmente aparente a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones a la misma. Además, la descripción anterior, con fines de explicación, ha usado nomenclatura específica para proporcionar una comprensión exhaustiva de la invención. Sin embargo, a un experto en la técnica le resultará aparente que no se requieren los detalles específicos para poner en práctica la invención. Por tanto, las descripciones anteriores de realizaciones específicas de la presente invención se presentan con fines de ilustración y descripción; no se pretende que sean exhaustivas ni que limiten la invención a las formas precisas dadas a conocer. Muchas modificaciones y variaciones son posibles en vista de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones se eligieron y describieron con el fin de explicar los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas y permitir de ese modo a otros expertos en la técnica usar la invención.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:



5

Fórmula I

en la que:

10

R¹ es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, un grupo protector, o se toma junto con R² para formar un anillo,

15

R² es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, un grupo protector, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^6$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^6)=CH_2$, o se toma junto con R¹ para formar un anillo,

20

R³ y R⁴ son independientemente H o alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector, o, cuando R¹ se toma junto con R² para formar un anillo, al menos uno de R³ o R⁴ es $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^5$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^5$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^5$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^5)=CH_2$, o cuando R¹ no se toma junto con R² para formar un anillo, R² no es H o alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

25

R⁵ es H, -OH, -SH, -O-alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, halógeno, NH₂, -succinimidilo, -maleimidilo, portador inmunogénico o marcador,

30

R⁶ es H, -OH, -SH, -O-alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, halógeno, NH₂, -succinimidilo, -maleimidilo, portador inmunogénico o marcador, y

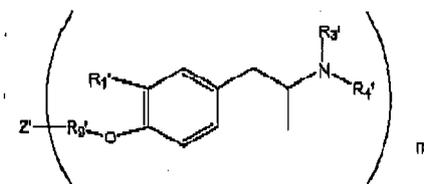
35

n es un número entero de desde 1 hasta 5,

e incluyendo sales de ácido del mismo.

40

2. Compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula



en la que:

45

R^{1'} es H,

R^{3'} es H o metilo o etilo,

50

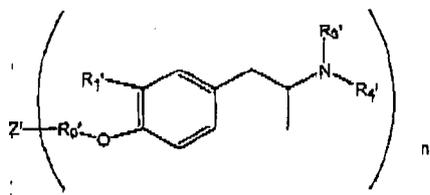
R^{4'} es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector

R^9 es $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^6$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^6)=CH_2$,

R^6 es Z' , que es una enzima, y

5 n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha enzima dividido entre 500.

3. Compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula



10

en la que:

R^1 es H,

15 R^3 es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector

R^4 es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector

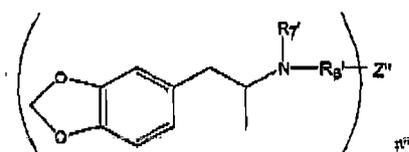
20

R^9 es $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^6$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^6)=CH_2$,

R^6 es Z' , que es una proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido), y

25 n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido) dividido entre 500.

4. Compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula



30

en la que:

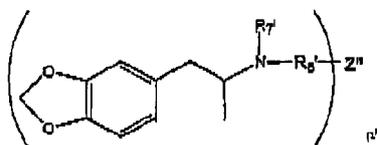
35 R^7 es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector

R^6 es $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^5$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^5$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^5$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^5)=CH_2$,

40 R^5 es Z'' , que es una proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido), y

n'' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido) dividido entre 500.

45 5. Compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula



en la que:

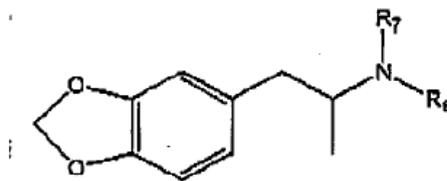
5 R^7 es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector

$R^{5'}$ es $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^{5'}$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^{5'}$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^{5'}$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^{5'})=CH_2$,

10 $R^{5'}$ es Z'' , que es una enzima, y

n'' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha enzima dividido entre 500.

15 6. Compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



Fórmula II

20 en la que:

25 R^7 es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, un grupo protector, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^5$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^5$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^5$ o $-(CH_2)_n(SO_2R^5)=CH_2$,

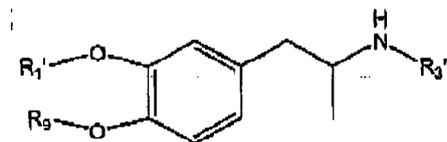
R^8 es H, alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, un grupo protector, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)R^5$, $-C(O)(CH_2)_nNHC(O)(CH_2)_nSR^6$, $-(CH_2)_nSCH_2C(O)R^5$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^5)=CH_2$,

30 R^5 es H, -OH, -SH, -O-alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, halógeno, NH_2 , portador inmunogénico, -succinimidilo, -maleimidilo o marcador, y

35 n es un número entero de desde 1 hasta 5,

con la condición de que al menos uno de R^7 y R^8 no son H o alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, e incluyendo las sales de ácido del mismo.

40 7. Compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



45 en la que:

R^3 es H, metilo o etilo o un grupo protector,

R^1 es H o alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector,

50 R^9 es un grupo protector, $-(CH_2)SCH_2C(O)R^6$ o $-(CH_2)_nC(SO_2R^6)=CH_2$,

R^6 es H, -OH, -SH, -O-alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, halógeno, NH_2 , portador

- inmunogénico, -succinimidilo, -maleimidilo o marcador, y
n es un número entero de desde 1 hasta 5,
- 5 e incluyendo sales de ácido del mismo.
8. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho portador inmunogénico es un poli(aminoácido).
9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que dicho poli(aminoácido) es una proteína.
- 10 10. Compuesto según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en KLH, BSA, BGG y ovoalbúmina.
11. Compuesto según la reivindicación 1, 6 ó 7, en el que n es 1.
- 15 12. Compuesto según la reivindicación 1, 6 ó 7, en el que dicho marcador es una enzima, un agente luminiscente o un radioisótopo.
13. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho marcador es una enzima, un agente luminiscente o un radioisótopo y en el que R⁷ es H o alquilo inferior que es un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono.
- 20 14. Anticuerpos generados contra el entactógeno del compuesto según la reivindicación 9 ó 10.
- 25 15. Método para determinar en una muestra un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilamfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA), comprendiendo dicho método:
- (a) proporcionar en combinación en un medio:
- 30 (i) una muestra que se sospecha que contiene dicho compuesto y
- (ii) un anticuerpo generado contra el entactógeno del compuesto según la reivindicación 1, en el que R⁵ y R⁶ son un portador inmunogénico, y
- 35 (b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicho compuesto en dicha muestra y dicho anticuerpo, indicando la presencia del mismo la presencia de dicho compuesto en dicha muestra.
- 40 16. Método según la reivindicación 15, en el que dicha combinación comprende además:
- (iii) un conjugado de marcador según la reivindicación 1, en el que R⁵ y R⁶ son un marcador, excluyendo sales de compuestos según la reivindicación 1 y dicho examen comprende medir la señal de dicho marcador, estando relacionada la cantidad del mismo con la presencia de dicho compuesto en dicha muestra.
- 45 17. Método según la reivindicación 16, en el que dicho método es un método homogéneo y dicho medio se examina para determinar la cantidad de dicha señal.
- 50 18. Método según la reivindicación 15, en el que dicho método es un método heterogéneo y dicho complejo, si está presente, está separado de dicho medio.
19. Método según la reivindicación 15, en el que dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en KLH, BSA, BGG y ovoalbúmina.
- 55 20. Método según la reivindicación 15, en el que n es 1.
21. Método según la reivindicación 16, en el que dicho marcador es una enzima, un agente luminiscente o un radioisótopo.
- 60 22. Kit para determinar en una muestra un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilamfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA), comprendiendo dicho kit:
- 65 (a) un anticuerpo generado contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 1 en el que R⁵ y R⁶ son un portador inmunogénico, y

- (b) reactivos auxiliares para determinar dicho compuesto en dicha muestra.
- 5 23. Kit para determinar en una muestra un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilamfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA), comprendiendo dicho kit:
- (a) un anticuerpo para dicho compuesto,
- 10 (b) un conjugado de marcador según la reivindicación 1, en el que R⁵ y R⁶ son un marcador, y
- (c) reactivos auxiliares para determinar dicho compuesto en una muestra.
- 15 24. Kit según la reivindicación 22, en el que dicho portador inmunogénico se selecciona del grupo que consiste en KLH, BSA, BGG y ovoalbúmina,
25. Kit según la reivindicación 22, en el que n es 1.
- 20 26. Kit según la reivindicación 23, en el que dicho marcador es una enzima, un agente luminiscente o un radioisótopo.
27. Kit que comprende en combinación envasada:
- 25 (i) un anticuerpo para metilendioxfanfetamina, y/o
- (ii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioxi-etanfetamina, y
- 30 (iv) compuesto según la reivindicación 5.
28. Kit que comprende en combinación envasada:
- 35 (i) un anticuerpo para metilendioxfanfetamina,
- (ii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioxi-etanfetamina, y
- 40 (iv) compuesto según la reivindicación 3, en el que R^{1'} es OH.
29. Kit que comprende en combinación envasada:
- 45 (i) un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxfanfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioximetanfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxi-etanfetamina, y
- 50 (ii) un anticuerpo para metilendioxfanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 4, en el que R^{7'} es H, o un compuesto según la reivindicación 3, en el que R^{1'} es OH, R^{3'} es H y R^{4'} es H; y/o
- 55 (iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 4, en el que R^{7'} es metilo, o un compuesto según la reivindicación 3, en el que R^{1'} es OH, R^{3'} es metilo y R^{4'} es H; y/o
- 60 30. Método para determinar metilendioxfanfetamina y/o metilendioxi-metanfetamina y/o metilendioxi-etanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxfanfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxi-etanfetamina, comprendiendo dicho método:
- 65 (a) proporcionar en combinación en un medio:
- (i) dicha muestra,

(ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o

(iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y

(v) un compuesto según la reivindicación 2, en el que R¹ es OH,

y

(b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia del mismo la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

31. Método para determinar metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) dicha muestra,

(ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o

(iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y

(v) un compuesto según la reivindicación 5

y

(b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia del mismo la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

32. Método para determinar metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) dicha muestra,

(ii) un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxianfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioximetanfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxietanfetamina,

(i) un anticuerpo, para metilendioxianfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 3, en el que R¹ es OH y R³ es H y/o

(ii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 3, en el que R¹ es OH y R³ es metilo y/o

(iii) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 3, en el que R¹ es OH y R³ es etilo

y

- 5 (b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia del mismo la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.
- 10 33. Método para determinar metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina, comprendiendo dicho método:
- 15 (a) proporcionar en combinación en un medio:
- 15 (i) dicha muestra,
- 20 (ii) un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxianfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioximetanfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxietanfetamina,
- 25 (iii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 4, en el que R⁷ es H y/o
- 25 (iv) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 4, en el que R⁷ es metilo y/o
- 30 (v) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, estando generado dicho anticuerpo contra un entactógeno de un compuesto según la reivindicación 4, en el que R⁷ es etilo
- 30 y
- 35 (b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia del mismo la presencia de dicha anfetamina y/o metanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

Figura 1. Síntesis de inmunógeno de MDMA-KLH (10)

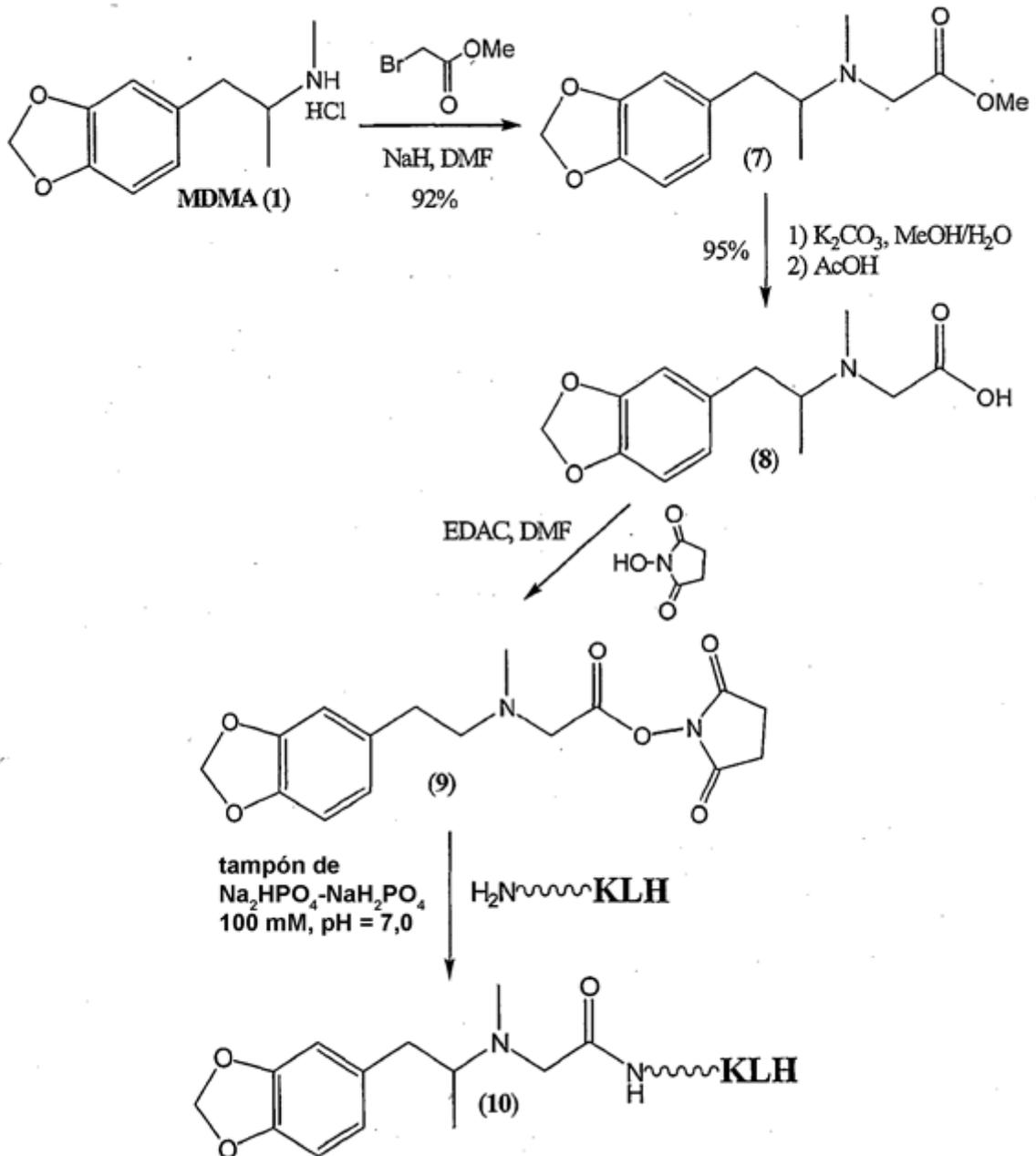


Figura 2. Síntesis de inmunógeno de MDA-KLH (14)

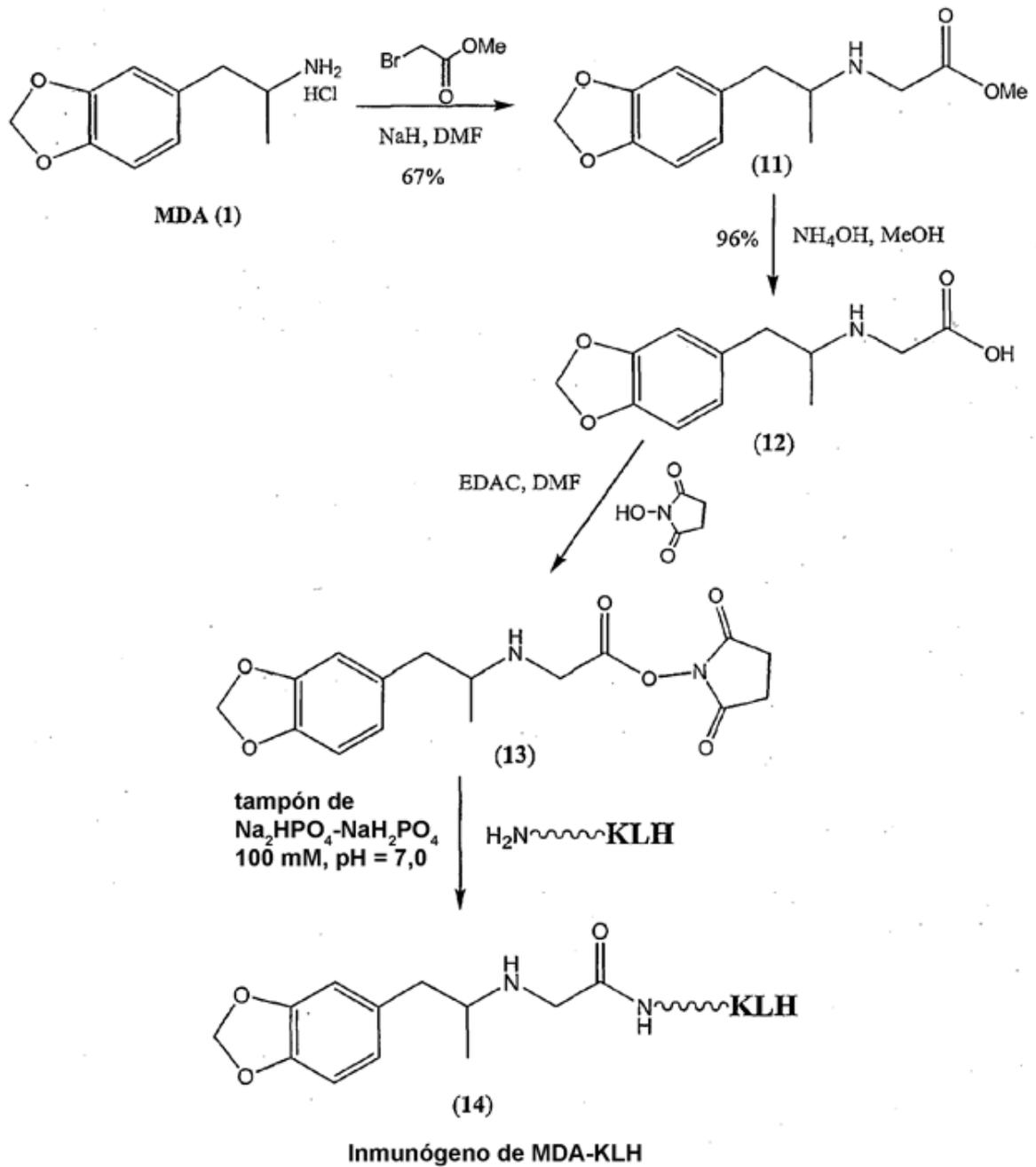


Figura 3. Síntesis de haptenos de MDMA (15)-(17)

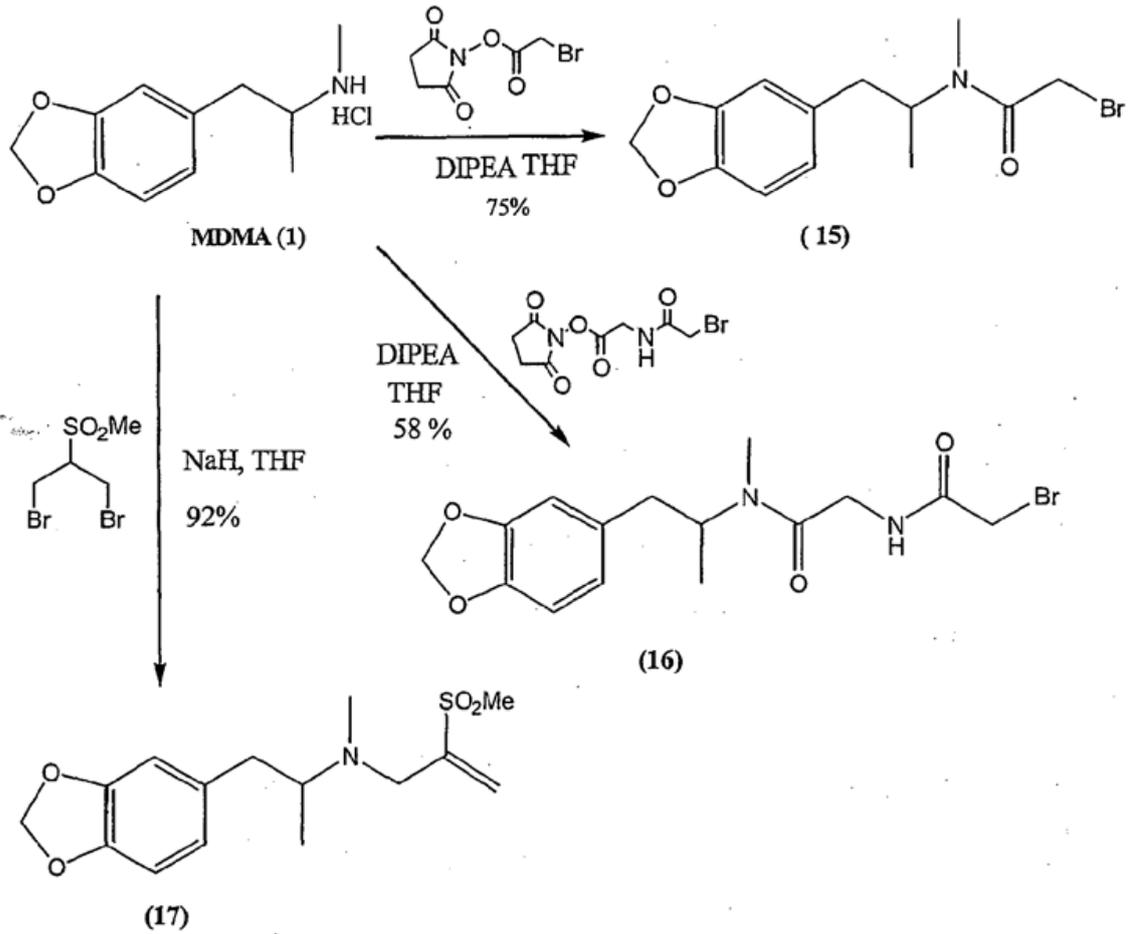


Figura 4A. Síntesis de haptenos de MDA (18)-(19)

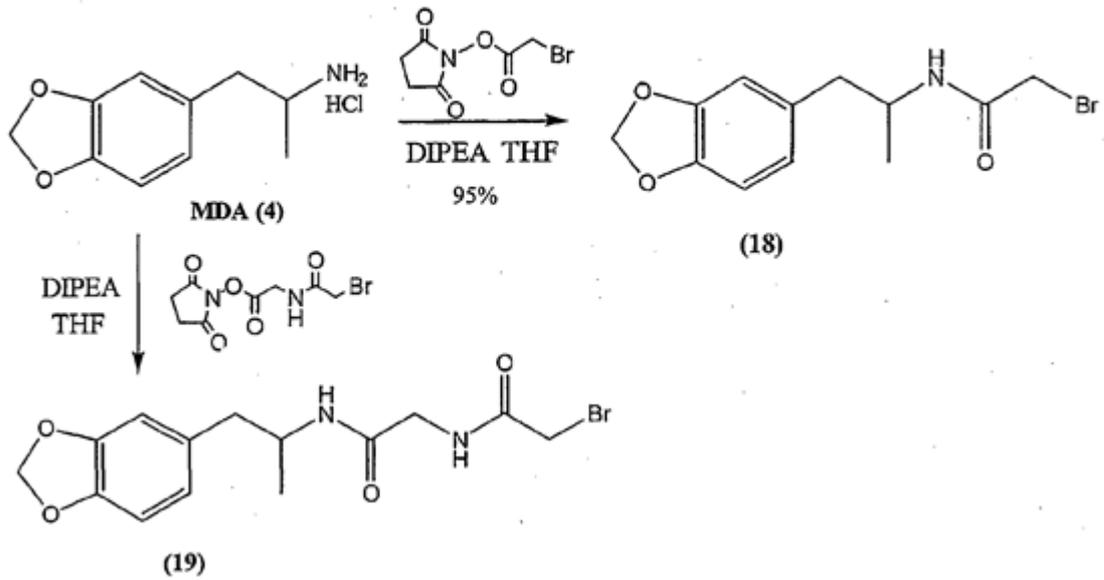


Figura 4B. Síntesis de hapteno de MDA (20)

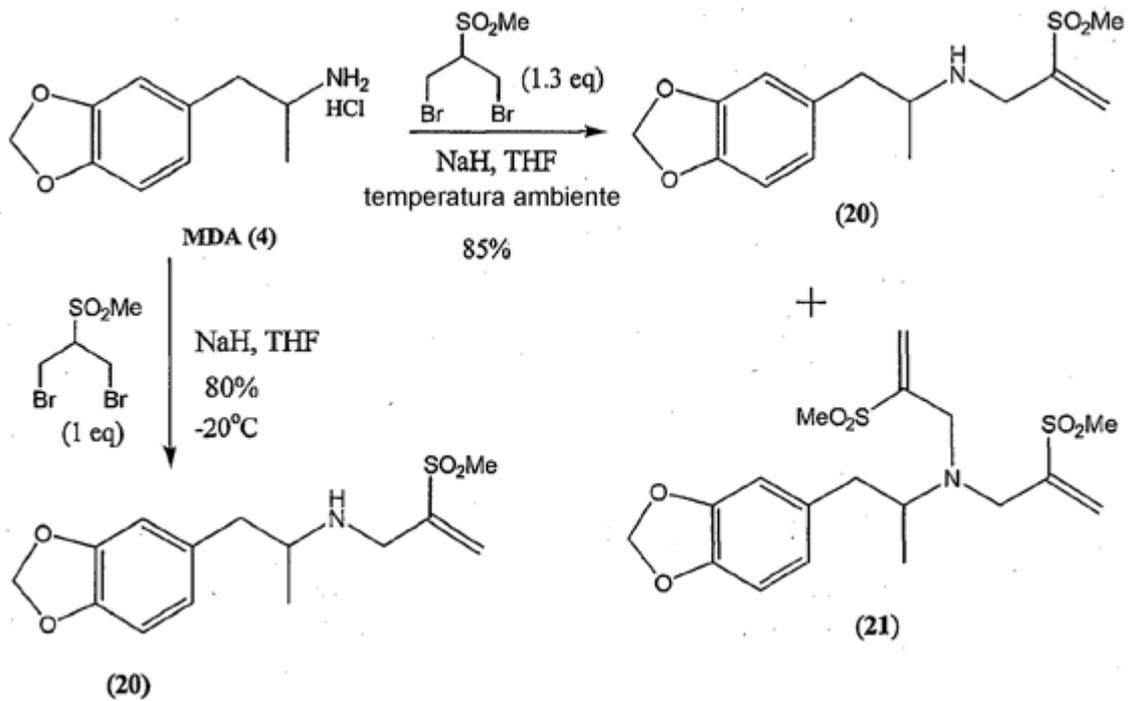


Figura 5. Síntesis de producto intermedio de HMMA (29) para el inmunógeno (30)

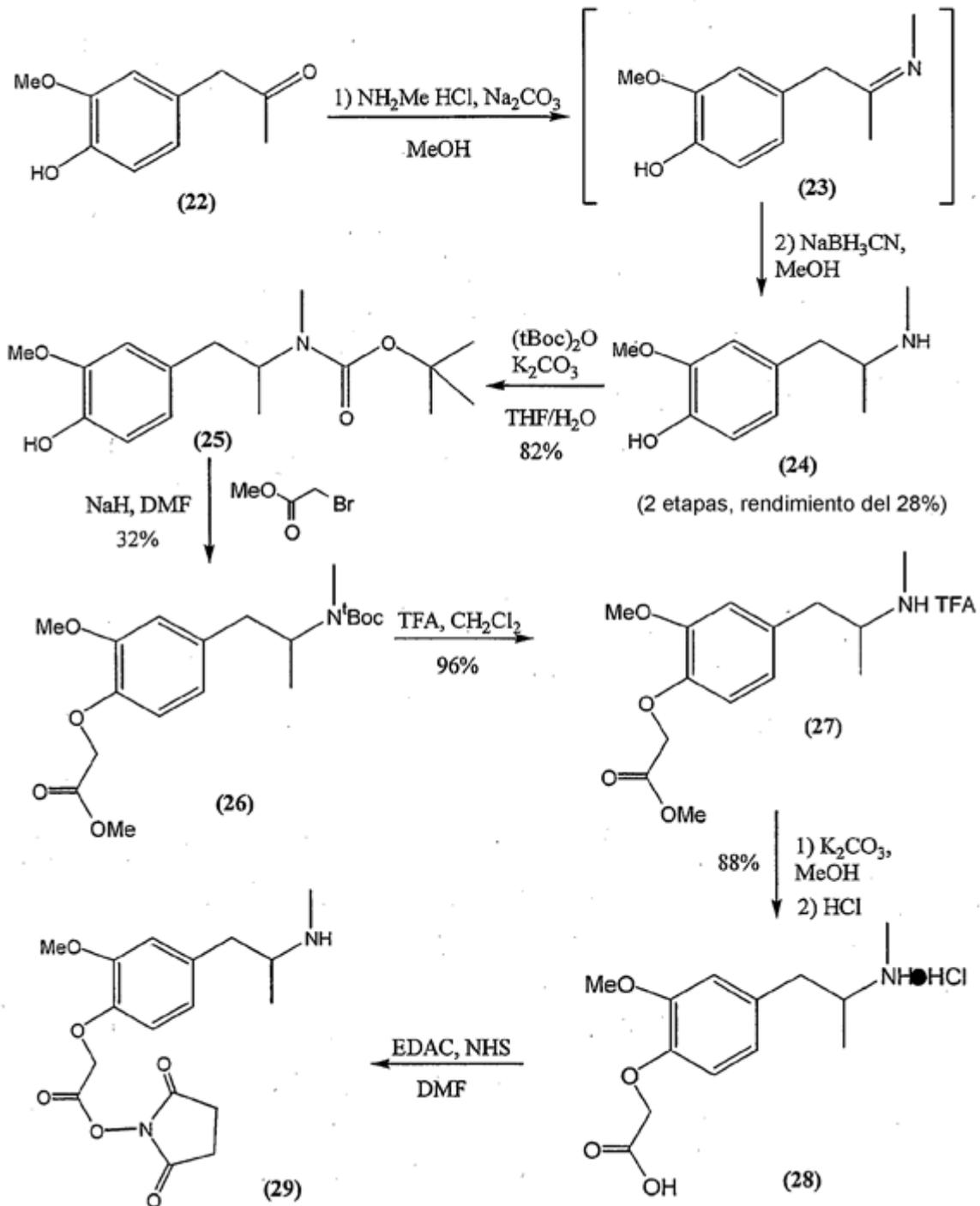


Figura 6. Síntesis de inmunógeno de HMMA-KLH (30)

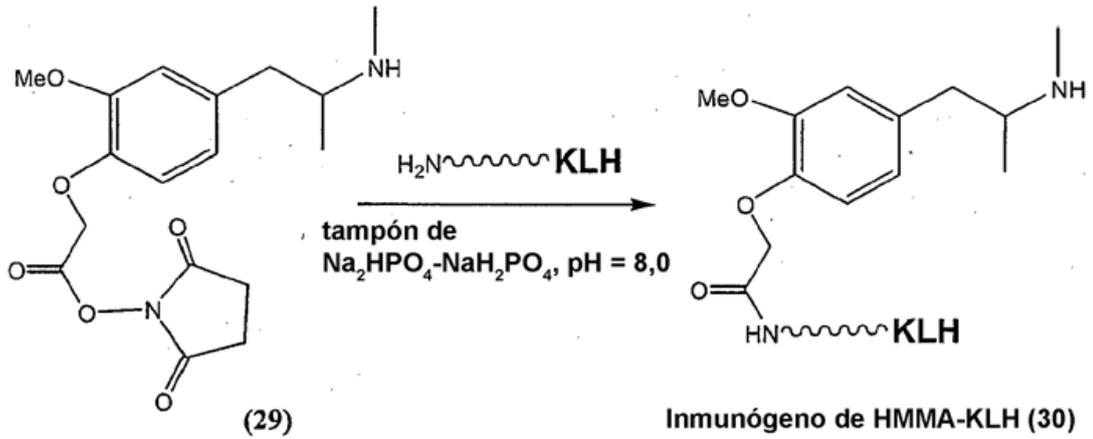


Figura 7. Síntesis de inmunógeno de HMMA-KLH (36)

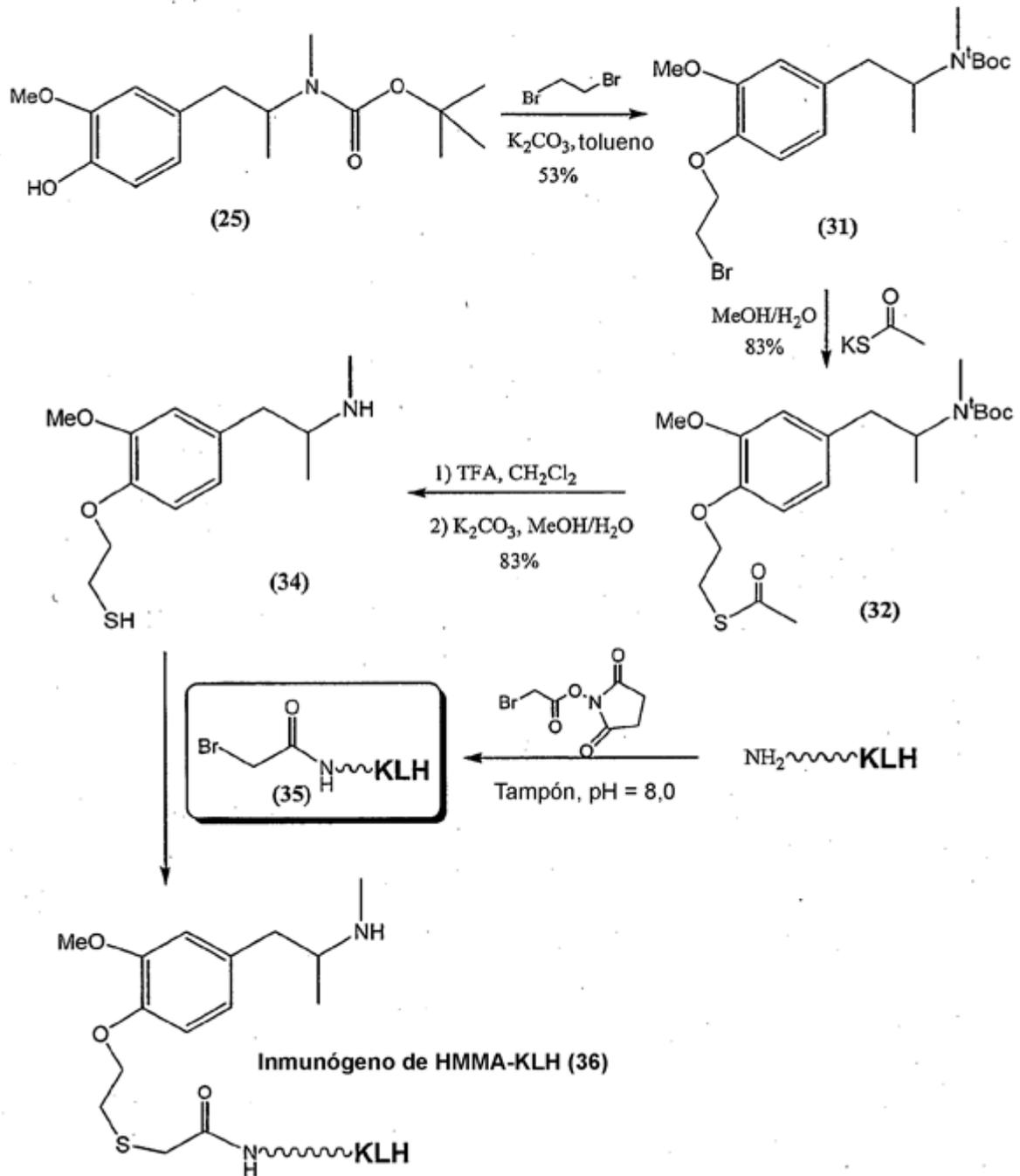


Figura 8A. Síntesis de hapteno de MDMA (38)

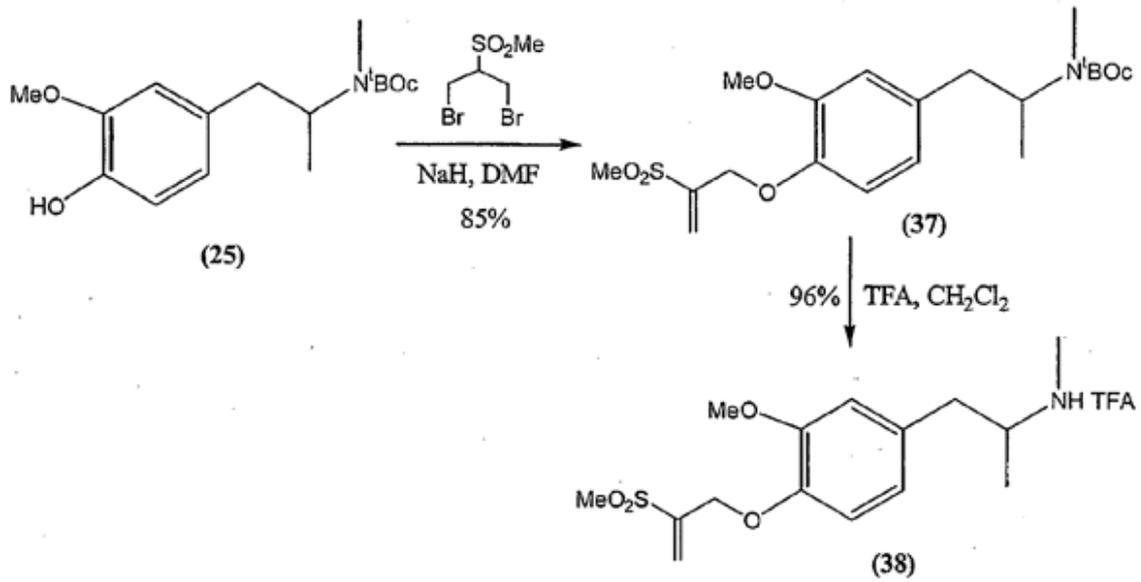


Figura 8B. Síntesis de producto intermedio de hapteno de MDMA (40)

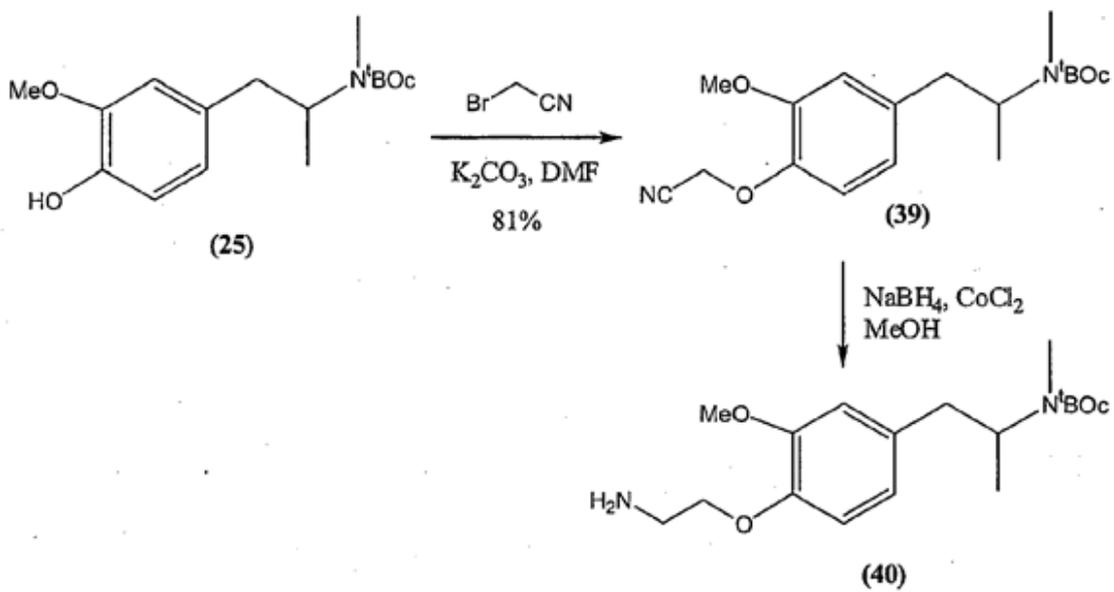
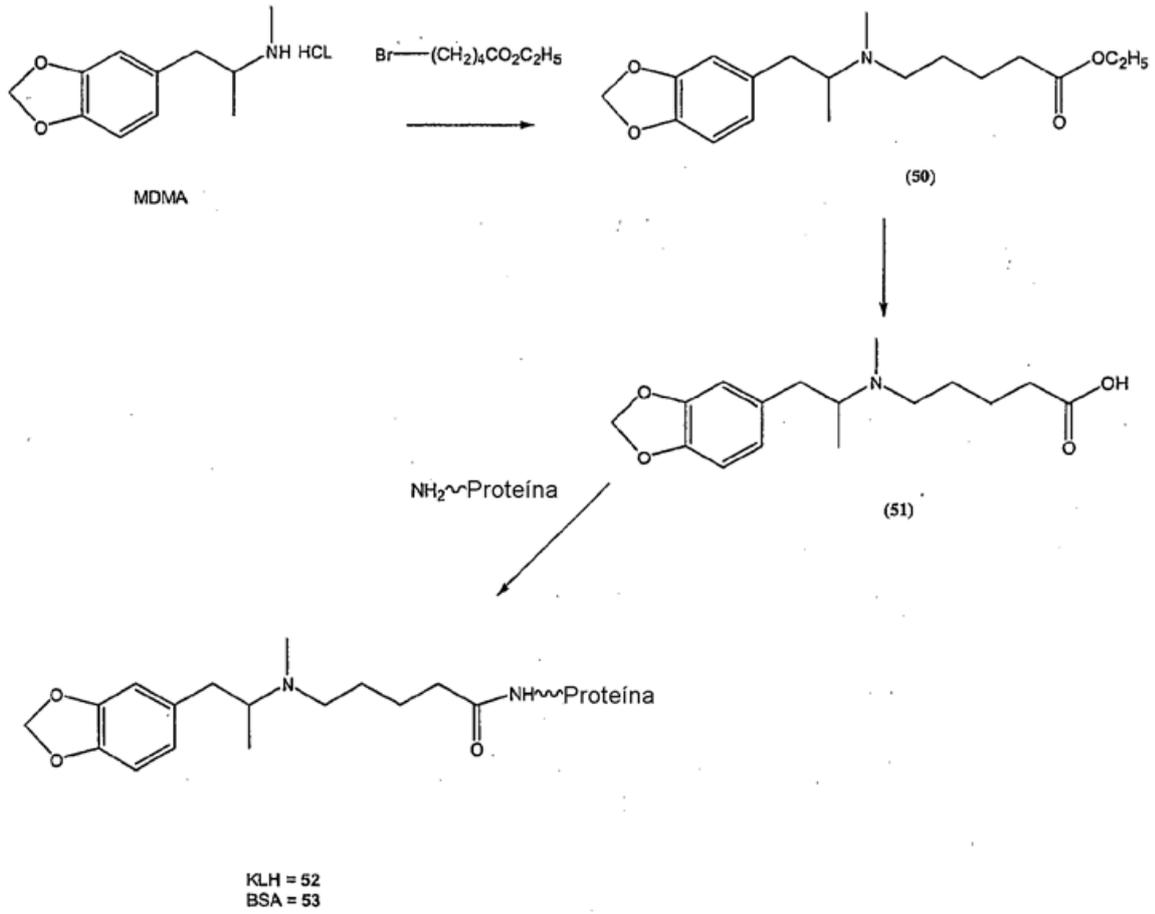


FIG. 9



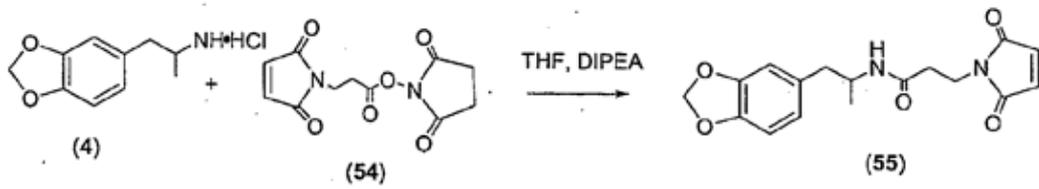


FIG. 10

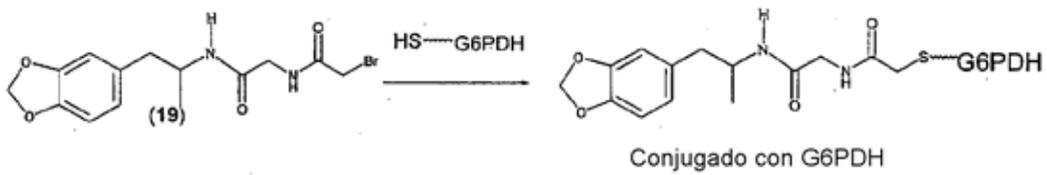


FIG. 11

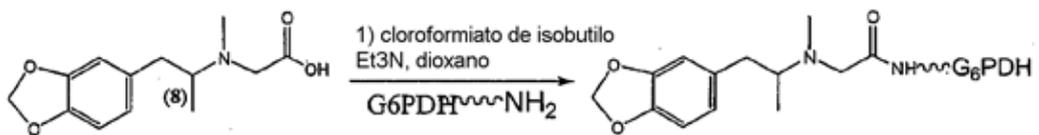


FIG. 12

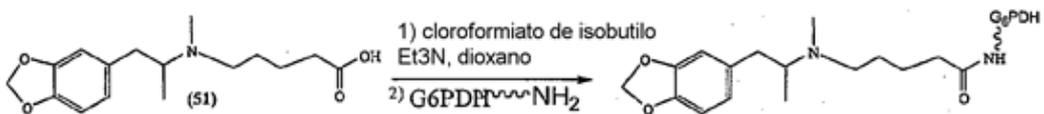


FIG. 13

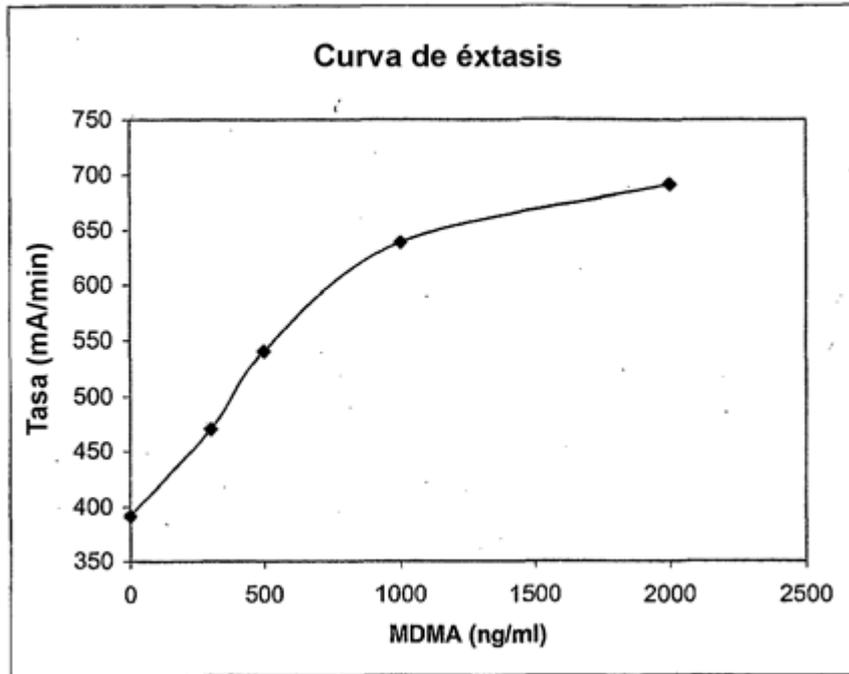


FIG. 14

Recuperación de MDMA mediante el ensayo de éxtasis

| Concentración de éxtasis nominal (ng/ml) | Conc. de éxtasis (ng/ml) |
|--|--------------------------|
| 200 | 191 |
| 250 | 241 |
| 375 | 360 |
| 450 | 428 |
| 750 | 730 |
| 1250 | 1222 |
| 1500 | 1478 |

FIG. 15