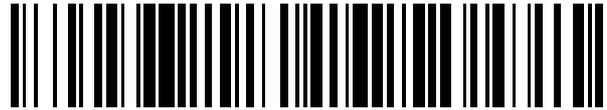


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 154**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2011 E 11185628 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2442110**

54 Título: **Detección de drogas**

30 Prioridad:

**19.10.2010 GB 201017597**

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

**08.07.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro**

**ES 2 474 154 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).

**DESCRIPCION****ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5 La mefedrona, cuya denominación sistemática es (RS)-2-metilamino-1-(4-metilfenil)propan-1-ona, es una droga de  
diseño de la clase de estimulantes catinona causante de un número de fallecimientos por su consumo. Es ilegal en  
varios países del mundo, pero a pesar de su ilegalidad, varios estudios recientes destacan que no ha disminuido ni  
su popularidad ni la facilidad con la que se consigue, debido al nuevo enfoque que los proveedores han dado a la  
10 marca, denominando a los productos de la mefedrona como "alternativos", asignándoles un nombre como NRG-1  
(Energía 1) y etiquetándolos como "euforizantes legales" (*legal highs* en inglés) que contienen naftilpirovalerona, que  
no es más que mefedrona (Brandt y col. 2010a; Brandt y col. 2010b). El metabolismo de la mefedrona se produce a  
través de varias combinaciones de la oxidación del grupo metilo unido al anillo de benceno, N-desmetilación y la  
reducción de la función ceto (Meyer y col. 2010). Existe un alto porcentaje de posibilidades de las personas que  
15 pueden conseguir con facilidad la mefedrona sufran acontecimientos adversos o abusen de su consumo,  
especialmente cuando se presenta como NRG-1 ya que, por las campañas de marketing dirigidas al gran público, da  
la impresión de ser segura. Por lo tanto, existe una necesidad en la toxicología clínica y forense de detectarla o  
determinarla utilizando métodos de análisis prácticos y económicos. El documento EP 1340980 da a conocer  
inmunoensayos sensibles y específicos para detectar la clase metilendioxi de drogas de éxtasis. Findlay y col. (J. of  
20 Pharm. Sci., 1981, vol 70: 624-621) divulgaron un radioinmunoensayo estereoespecífico de d-pseudoefedrina para  
su uso en estudios de disposición del fármaco. Los métodos de análisis que se han utilizado para detectar e  
identificar la mefedrona y sus metabolitos incluyen la cromatografía de gases vinculada a la espectrometría de  
masas (GC-MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) (Brandt y col. 2010a; Wood y col. 2010; Meyer y col.  
2010). Según los inventores, aún no ha salido a la luz ningún inmunoensayo menos costoso y práctico para detectar  
o cuantificar la mefedrona o sus metabolitos.

25

**Bibliografía**

Brandt S.D. y col. (2010a). *Drug Test. Anal.*, 2: 377-382.  
Brandt S.D. y col. (2010b). *BMJ*, 341: c3564.  
30 Wood D.M. (2010). *J. Med. Toxicol*, 6: 327-330.  
Meyer M.R. (2010). *Anal. Bioanal. Chem.*, 397: 1225-1233.

**COMPENDIO DE LA INVENCION**

35 No existe una prueba barata y práctica para detectar e identificar la mefedrona, sus metabolitos y sus compuestos  
relacionados en muestras de pacientes *in vitro*. La presente invención ofrece una solución a este problema,  
proporcionando un anticuerpo que se une a la mefedrona, los metabolitos de la mefedrona y aquellos compuestos  
con la estructura 2-metilamino-1-fenilpropano-1. En resumen: para superar las deficiencias asociadas con las  
40 técnicas analíticas actuales, los inventores idearon y desarrollaron un inmunoensayo para detectar y cuantificar la  
mefedrona, los metabolitos de mefedrona y los compuestos relacionados con la misma, basándose en nuevos  
anticuerpos. El inmunoensayo tiene muchas ventajas sobre otros formatos analíticos utilizados comúnmente, como  
la cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN), con un  
coste menor y mayor facilidad de uso, además de poder fabricarse en un formato compacto o portátil para su uso en  
45 el terreno.

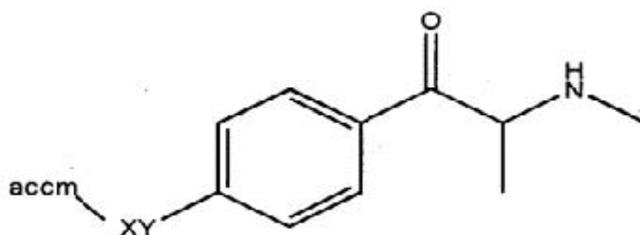
45

**DIBUJOS**

Figura 1 Ruta sintética de la mefedrona.  
Figura 2 Metabolitos de la mefedrona.  
50 Figura 3 Hapteno 1 e Inmunógeno 1

**EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

55 La invención presente está definida en su sentido más amplio por las reivindicaciones anexadas.  
Un primer aspecto de la invención es un inmunógeno de la estructura:

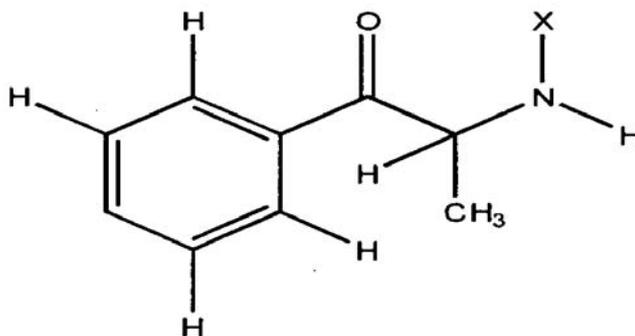


5 donde accm es un material portador que confiere antigenicidad; X es carbonilo o amino; Y es  $-(A)_n-$  donde Z es alqueno  $C_{1-5}$  de cadena lineal sustituido o no sustituido o una fracción de arileno y A es O, NH, S, éster, tioéster o amida y  $n = 0$  o 1.

10 Preferiblemente, X es carbonilo o amino y Z es un  $C_{1-5}$ , preferiblemente un alqueno  $C_{1-3}$  de cadena lineal no sustituido seleccionado del metileno, etileno y propileno, y donde  $n = 1$  y A = O, NH o S. Una realización preferida de la invención es un inmunógeno en el que X = carbonilo, Z =  $-CH_2-$  y en la que  $n = 1$  y A = O. En una forma de realización, antes de la conjugación a la accm,  $-XY-$  es  $(COOH)-CH_2-O-$ .

15 La accm puede ser cualquier material que hace que la totalidad o parte del hapteno sea susceptible de ser reconocido por un anticuerpo y de producirse la unión. La accm es una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. Los ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles que confieren antigenicidad son la albúmina de suero bovino (BSA), la ovoalbúmina de huevo, la gammaglobulina bovina, la tiroglobulina bovina (BTG), la hemocianina de lapa californiana (KLH), etc. La accm también se puede seleccionar de la albúmina de suero bovino (BSA) y la tiroglobulina bovina (BTG). En una realización, el inmunógeno es hapteno-1 acoplado a BSA (Ilustración 3). Los inmunógenos obtenidos se administran después a mamíferos para inducir la producción de anticuerpos específicos y opcionalmente anticuerpos policlonales que luego se utilizan para desarrollar inmunoensayos para mefedrona, metabolitos de mefedrona y compuestos que componen la estructura 2-  
20 metilamino-1-fenil-propan-1-ona (metacatinona) y empleando conjugados marcados como reactivos de detección.

25 Un segundo aspecto de la invención es la generación de un anticuerpo contra cualquiera de los inmunógenos previamente descritos, siendo dicho anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de una molécula con la siguiente estructura (Estructura 1), en la que X puede ser H o  $CH_3$

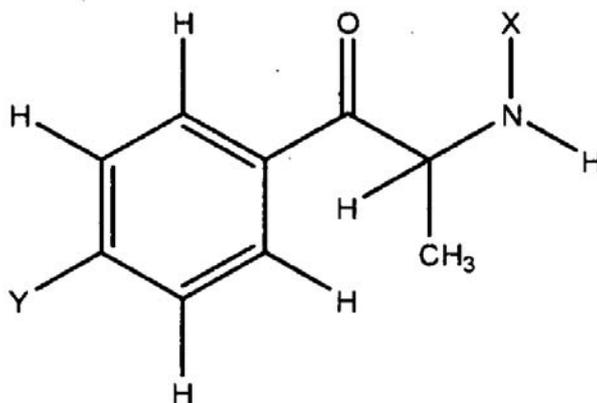


Estructura 1

30 Los átomos de hidrógeno explícitos en la estructura anterior implican que los átomos a los que están unidos estos átomos de hidrógeno explícitos no pueden ser sustituidos por otros, es decir el anticuerpo producido por los inmunógenos de la invención se une a un epítipo de moléculas que componen la subestructura de arriba (donde X = H o  $CH_3$ ), la cual incluye moléculas sustituidas en posición "para" del anillo de fenilo ("para" a la fracción de propionil). Los sustituyentes en la posición "para" pueden ser cualquier tipo de sustituyente que dé lugar a una molécula que entre dentro del marco de la invención, es decir, que dé lugar a una molécula que se clasifique como un estimulante a base de catinona. Por ejemplo, sin limitar la invención a los mismos, los sustituyentes en la posición "para" puede seleccionarse a partir de H,  $CH_3$ ,  $-O-CH_3-$  o F, o cualquier otra fracción apropiada.

40 Cuando X es H y H está presente en la posición "para" del anillo de fenilo, la Estructura 1 es catinona. Cuando X es  $CH_3$  y H está presente en la posición "para" del anillo de fenilo, la Estructura 1 es 2-(metilamino)-1-fenilpropan-1-ona (metacatinona). Cuando X es  $CH_3$  y  $CH_3$  está presente en la posición "para" del anillo de fenilo, la Estructura 1 es mefedrona (4-metilmetacatinona). Cuando X es  $CH_3$  y  $-O-CH-$  está presente en la posición "para" del anillo de fenilo, la Estructura 1 es 4-metoximetacatinona (para-metoximetacatinona, mefedrona). Cuando X es  $CH_3$  y H está

presente en la posición "para" del anillo de fenilo, la Estructura 1 es 4-fluorometacatinona (fledrona). Por lo tanto, la Estructura 1 puede representarse mediante la Estructura 2:



5

Estructura 2

10 donde Y puede ser cualquier sustituyente que dé lugar a una molécula que entre dentro del ámbito de la invención, es decir una molécula clasificada como un estimulante basado en la catinona. Por ejemplo, sin limitar la invención a los mismos, Y puede seleccionarse a partir de H, CH<sub>3</sub>, -O-CH<sub>3</sub>- o F, o cualquier otra fracción apropiada. Cuando X es H e Y es H. La Estructura 2 es catinona. Cuando X es CH<sub>3</sub> e Y es H, la Estructura 2 es 2-metilamino-L-fenilpropan-1-ona (metacatinona). Cuando X es CH<sub>3</sub> e Y es CH<sub>3</sub>, la Estructura 2 es mefedrona (4-metilmetcatinona).  
15 Cuando X es CH<sub>3</sub> e Y es -O-CH<sub>3</sub>-. La Estructura 2 es 4-metoximetacatinona (fledrona). Cuando X es CH<sub>3</sub> e Y es F, la Estructura 1 es 4-fluorometacatinona (fledrona).

20 Preferiblemente, el anticuerpo es específico para un epítipo de mefedrona y posee reactividad cruzada de más de un 10%, preferiblemente mayor al 15% respecto a un epítipo de cada uno de catinona y metacatinona. Por lo tanto, el anticuerpo tiene una reactividad cruzada tanto a catinona y metacatinona, superior al 10%, preferiblemente superior a un 15%.

25 Los anticuerpos de la invención también se unen a metabolitos de mefedrona (Ilustración 2). Cuando se utiliza haciendo referencia a un anticuerpo, la palabra específica en el contexto de la presente invención se refiere al analito que está unido preferentemente por el anticuerpo, tal como se ha medido mediante una métrica adecuada como la reactividad cruzada; es decir, el analito con la mayor reactividad cruzada es el analito específico del anticuerpo y, en general, se le atribuye un valor del 100%, con todos los otros analitos con un valor relativo a este. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal (el anticuerpo monoclonal se deriva a partir del anticuerpo policlonal por medio de métodos ya conocidos); si el anticuerpo policlonal posee la especificidad y la sensibilidad requerida y se produce en cantidades adecuadas, el desarrollo de un anticuerpo monoclonal resulta innecesario.  
30

35 Un aspecto adicional de la invención es un método de detección o determinación de una molécula o moléculas que conformen la Estructura 1 en una muestra *in vitro* tomada de un paciente. El método consiste en poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención y un conjugado, midiendo el conjugado y deduciendo a partir de un calibrador la presencia o cantidad de la molécula o moléculas que forman la Estructura 1. Un aspecto adicional de la invención es un método de detección o determinación de mefedrona, metacatinona y catinona en una muestra *in vitro* tomada de un paciente. El método consiste en poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención y un conjugado, midiendo el conjugado y deduciendo a partir de un calibrador la presencia o cantidad de una o más moléculas de mefedrona, metacatinona y catinona. La mefedrona se prefiere especialmente como un objetivo del método. Los metabolitos de mefedrona también se pueden detectar y determinar utilizando este método. El término "detección" se refiere a analizar cualitativamente la presencia o ausencia de una sustancia. El término "determinación" se refiere a analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia.  
40

45 Otro aspecto de la invención es un kit para detectar o determinar una molécula o moléculas de la Estructura 1, que incluye un anticuerpo de la invención. Preferiblemente, el kit se utiliza para detectar o determinar una o más moléculas de mefedrona, metacatinona y catinona, pero preferiblemente de mefedrona. El kit también puede usarse para detectar metabolitos de la mefedrona. El kit puede incluir más conjugado(s) o calibrador(es) e instrucciones de uso de los componentes del kit.

A efectos de la invención, la muestra del paciente que se puede utilizar para el análisis *in vitro* puede ser pelo o un fluido biológico periférico, pero es preferible que sea suero, plasma u orina. Los conjugados del método se componen de los haptenos unidos a agentes de marcaje. Los haptenos de los conjugados son moléculas que pueden unirse a los anticuerpos del método. El uso de haptenos, conjugados y anticuerpos en el contexto de los inmunoensayos se conoce muy bien en este campo de especialidad. El agente de marcaje de los conjugados se selecciona a partir de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva, o una mezcla de las mismas. Preferiblemente, el agente de marcaje es una enzima; preferiblemente una peroxidasa; más preferiblemente peroxidasa de rábano picante (HRP). Como alternativa, o como algo adicional, la sustancia luminiscente puede ser un bioluminiscente, quimioluminiscente o material fluorescente.

## Métodos y resultados

### Preparación de haptenos inmunógenos y conjugados

Aunque los haptenos proporcionan epítomos estructurales definidos, no son en sí mismos inmunogénicos y por lo tanto necesitan ser conjugados con materiales portadores, lo que provocará una respuesta inmunógena al administrárselo a un animal. Los materiales portadores apropiados contienen por lo general segmentos de poli(aminoácido) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteínas. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son las albúminas de suero bovino (BSA), la ovoalbúmina de huevo, la gammaglobulina bovina, la tiroglobulina bovina (BTG), la hemocianina de lapa californiana (KLH), etcétera. Alternativamente, se pueden emplear sintéticos de poli(aminoácidos) con un número suficiente de grupos de amino disponibles, tales como la lisina, puesto que otros materiales poliméricos naturales o sintéticos pueden incluir grupos funcionales reactivos. Además, los carbohidratos, levaduras o polisacáridos pueden conjugarse con el hapteno para producir un inmógeno. Los haptenos también se pueden acoplar a un agente marcador detectable tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o una etiqueta radioactiva para la preparación de conjugados (o reactivos de detección) que se utilizan en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína, o un derivado de la misma. La formación de inmunógenos puede realizarse por varias rutas sintéticas.

La formación inmunógeno para la invención descrita en este documento implica una química de conjugación convencional. Con el fin de confirmar que se ha conseguido la conjugación adecuada del hapteno al material portador, antes de la inmunización, se evalúa cada antígeno utilizando la técnica de espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS por sus siglas en inglés).

### Procedimiento general para el análisis de MALDI-TOF de inmunógenos.

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

### Preparación de antisueros

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

### Desarrollo del inmunoensayo

El proceso de desarrollo de un inmunoensayo es bien conocido por la persona experta en la materia. En pocas palabras, para conseguir un inmunoensayo competitivo en el que el analito diana es una molécula no inmunógena, como un hapteno, se lleva a cabo el siguiente proceso: los anticuerpos se producen por inmunización de un animal, preferiblemente un mamífero, administrando de forma repetida un inmunógeno. El suero del animal inmunizado se recoge cuando el valor de anticuerpos es suficientemente alto. Se añade un conjugado a una muestra que contiene el analito diana y los anticuerpos producidos, y el conjugado y el analito compiten por la unión a los anticuerpos. El proceso puede incluir la fijación de dichos anticuerpos del suero a un sustrato de soporte tal como un soporte sólido de poliestireno o un biochip. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, pudiendo obtenerse los monoclonales a partir de sueros policlonales y utilizando técnicas estándar. La señal emitida en el inmunoensayo es proporcional a la cantidad de conjugado unido a los anticuerpos, que a su vez es inversamente proporcional a la concentración del analito. La señal puede detectarse o cuantificarse por comparación con un calibrador.

Ejemplo 1: Síntesis de mefedrona (Figura 1)i)  $\alpha$ -bromo-4-metilpropiofenona

5 Se añadió gota a gota 4-metilpropiofenona (30 g 0,202 mmol) en ácido acético (100 ml) a una solución de bromina (34 g 1,05 eq) en ácido acético (100 ml). La mezcla se agitó a TA durante 4 h. El ácido acético se eliminó al vacío. Al residuo se añadió agua (100 ml) y se extrajo con diclorometano (3 x 200 ml). Los extractos se combinaron y se lavaron con una solución de bicarbonato de sodio sat. (200ml) que se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice: 20% de acetato de etilo en hexano) para obtener el compuesto del epígrafe (43,9 g 95%) en un aceite amarillo.

## ii) Clorhidrato de mefedrona

15 Se añadió un 40% de metilamina en agua (44,8 ml. 3 eq) a  $\alpha$ -bromo-4-metilpropiofenona (45,2 g 0,199 mmol) en cloroformo (500 ml). La mezcla se lavó con agua (3 x 200 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad. El residuo bruto se disolvió en éter (200 ml) y se añadió una solución HC1 2M en éter (100 ml); la mezcla se agitó a TA durante una hora y se formó un sólido de color blanco. Esto se recuperó por filtración para obtener el compuesto del título (17,3 g 41%) como un sólido blanco.

20 Ejemplo 2: Síntesis de ácido fenoxicético 4-(2-metilaminopropionil) (hapteno 1)

25 Se agitó ácido fenoxicético 4-(2-bromopropionil) (5 g. 17,5 mmol) vigorosamente a 35-40 °C y se añadió una solución de metilamina al 40% en agua (4,05 ml 52 mmol) gota a gota durante 30 minutos. Se continuó la agitación a esta temperatura durante una 1,5 h más después de añadirla. La mezcla se evaporó hasta sequedad y el residuo bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice: 10 % de metanol en cloroformo) para obtener el producto del título (2,7 g 65%) como una espuma blanca.

Ejemplo 3: Síntesis de 1 hapteno-HRP

30 Se disolvieron 10 mg de clorhidrato de EDC en 0,6 ml de agua y todo se añadió inmediatamente a una solución de enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (20mg) en agua (1 ml). La solución resultante se añadió a una solución de 2mg de Hapteno 1 en DMF (0,2 ml). La solución resultante se añadió a sulfo-NHS (5 mg), y la mezcla se incubó en la oscuridad a 37 °C durante 16-20 horas, con agitación. El exceso de hapteno se eliminó con dobles columnas PD-10 (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS (pH 7,2) y el conjugado de hapteno 1-HRP se dializó durante la noche con 10 l de PBS (pH 7,2) a 4 °C.

Ejemplo 4: la conjugación de hapteno 1 a BSA (Inmunógeno 1)

40 A una solución del hapteno 1 (34,8 mg, 0,146 mmol) en 1 ml de DMF anhidro se añadió 10 N-hidroxisuccinamida (18,4 mg, 0,16 mmol) y N,N-diciclohexilcarbodimida (33 mg 0,43 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado blanco de la urea formada se separó por filtración y el filtrado se añadió gota a gota a una solución de BSA (150 mg) en 12 ml de bicarbonato de sodio de 0,1 M pH 8,5. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La solución se dializó con PBS (10L) durante 24 horas.

45 Mediante MALDI-TOF, un indicador importante, que indicaba una masa media protonada de 68,535 m/z, apareció en el inmunógeno. Los datos sugieren que se han conjugado por molécula de BSA una media de 9 moléculas de hapteno.

Ejemplo 5: la conjugación de hapteno 1 a BTG (Inmunógeno 2)

50 A una solución del hapteno 1 (34,8 mg 0,146 mmol) en 1 ml de DMF anhidro se añadió 20 N-hidroxisuccinimida (18,4 mg 0,16 mmol) y N,N-diciclohexilcarbodimida (33 mg 0,43 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado blanco de la urea formada se separó por filtración y el filtrado se añadió gota a gota a una solución de BTG (150 mg) en 12 ml de bicarbonato de sodio de 0,1 M, pH 8,5. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La solución se dializó con PBS (10L) durante 24 horas.

Ejemplo 6: Desarrollo de las pruebas ELISA para la mefedrona

60 El Hapteno 1 se conjugó con albúmina de suero bovino (BSA). El inmunógeno resultante (inmunógeno 1) se administró a ovejas adultas de forma mensual para obtener un antisuero policlonal específico. La IgG se extrajo a partir del antisuero a través de ácido caprílico/precipitación con sulfato de amonio de inmunoglobulina. Las placas de microtitulación (Thermo Scientific, 468667) se recubrieron con el anticuerpo (125  $\mu$ l) en un tampón de recubrimiento (10 mM Tris, pH 8,5) a 37 °C durante 2 horas. Las placas se lavaron 4 veces durante 10 minutos con TBST de concentración funcional. Se añadieron 50  $\mu$ l de muestra/estándar (metcatinona, Sigma M-5037; catinona, Sigma C-3196 y mefedrona, Randox LK973) a los pocillos correspondientes por triplicado, y a continuación 75  $\mu$ l de conjugado hapteno 1-HRP, que se incubó a 25 °C durante 1 hora. A continuación, se lavaron las placas y se añadieron 125  $\mu$ l de TMB (Randox, 4380-15) a cada pocillo, que se dejaron a temperatura ambiente durante 20

minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo con 125 µl de ácido sulfúrico 0,2 M. Las absorbancias se leyeron a 450 nm con un lector de microplacas ELISA (BioTek Instruments, Elx800) y se calcularon las medias.

Resultados

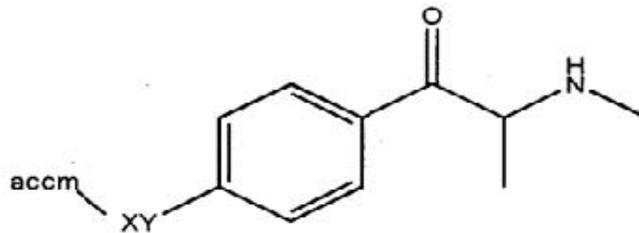
5 Los resultados de inmunoensayo competitivo con distintas concentraciones de anticuerpos y conjugados muestran que el anticuerpo se une a mefedrona, metacatinona y catinona (Tabla 1).

10 **Tabla 1** Los resultados ELISA confirman la unión de los anticuerpos producidos a la mefedrona y a compuestos estrechamente relacionados.

Conjugado	Estándar utilizado para la detección	Resultados ELISA				
		Anticuerpo disolución	Conjugado disolución	Absorb. Cero	Absorb. estándar	% Disminución
Hapteno 1-HRP	Metacatinona 100 ng/ml	5 ug/ml	1/4K	1,961	0,205	89,5 %
	Catinona 100 ng/ml			1,961	1,600	18,4 %
	Mefedrona 100 ng/ml			1,961	0,120	93,9 %
Hapteno 1-HRP	Metacatinona 100 ng/ml	1,25 ug/ml	1/8K	1,986	0,169	91,5%
	Catinona 100 ng/ml			1,986	1,515	23,7 %
	Mefedrona 100 ng/ml			1,986	0,087	95,6%

REIVINDICACIONES

5 1 - Un inmunógeno de la estructura



donde,

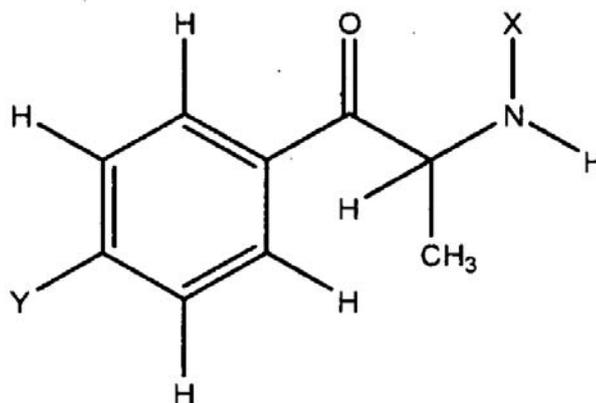
10 accm es un material portador que confiere antigenicidad, que consiste en un polipéptido sintético, un polipéptido semisintético, un fragmento de proteína o una proteína;  
 X es carbonilo o amino;  
 Y es -Z-(A)n-, en la que Z es un alqueno C<sub>1-5</sub> de cadena lineal sustituida o no sustituida o una fracción de arileno, A es O, NH, S, éster, tioéster o amida y n = 0, o 1.

15 2. El inmunógeno de la reivindicación 1 en el que accm es albúmina de suero bovino, ovalbúmina de huevo, gamma globulina bovina, tiroglobulina bovina o hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés)

20 3. Un inmunógeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que X es carbonilo o amino y Z es un alqueno de cadena lineal no sustituido CH<sub>1-5</sub>, n = 1 y A = O, NH o S.

4. Un inmunógeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en la que X = carbonilo, Z = -CH<sub>2</sub>-, n = 1 y A = O.

25 5. Un anticuerpo generado con un inmunógeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 que es específico para un epítipo de una molécula con la siguiente estructura:



Estructura 1

30 donde X=H o CH<sub>3</sub>

6. Un anticuerpo generado con un inmunógeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 que es específico para un epítipo de mefedrona.

35 7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el cual el anticuerpo posee una reactividad cruzada de más de un 10%, preferiblemente mayor de 15 % respecto a un epítipo tanto de catinona como metacatinona.

- 5 8. Un método de detección o determinación de una molécula o más moléculas de mefedrona, metcatinona y catinona en una muestra *in vitro* tomada de un paciente. El método consiste en poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención y un conjugado, midiendo el conjugado y deduciendo a partir de un calibrador la presencia o cantidad de la molécula o moléculas mefedrona, metcatinona y catinona.
9. Un kit para detectar o determinar una molécula o moléculas de la Estructura 1, que incluye un anticuerpo de la reivindicación 5.
- 10 10. El kit de la reivindicación 9 en el que la molécula o moléculas que van a detectarse o determinarse son una o más moléculas de mefedrona, metacatinona y catinona.
11. El kit de la reivindicación 9, que también comprende un conjugado o calibrador.
- 15 12. El anticuerpo descrito en la reivindicación 5, que es un anticuerpo policlonal.

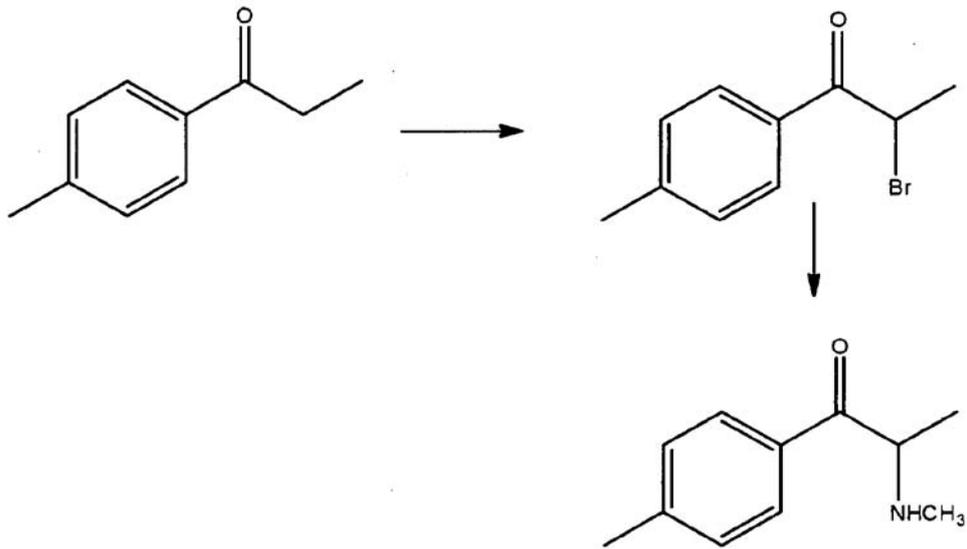


Figura 1

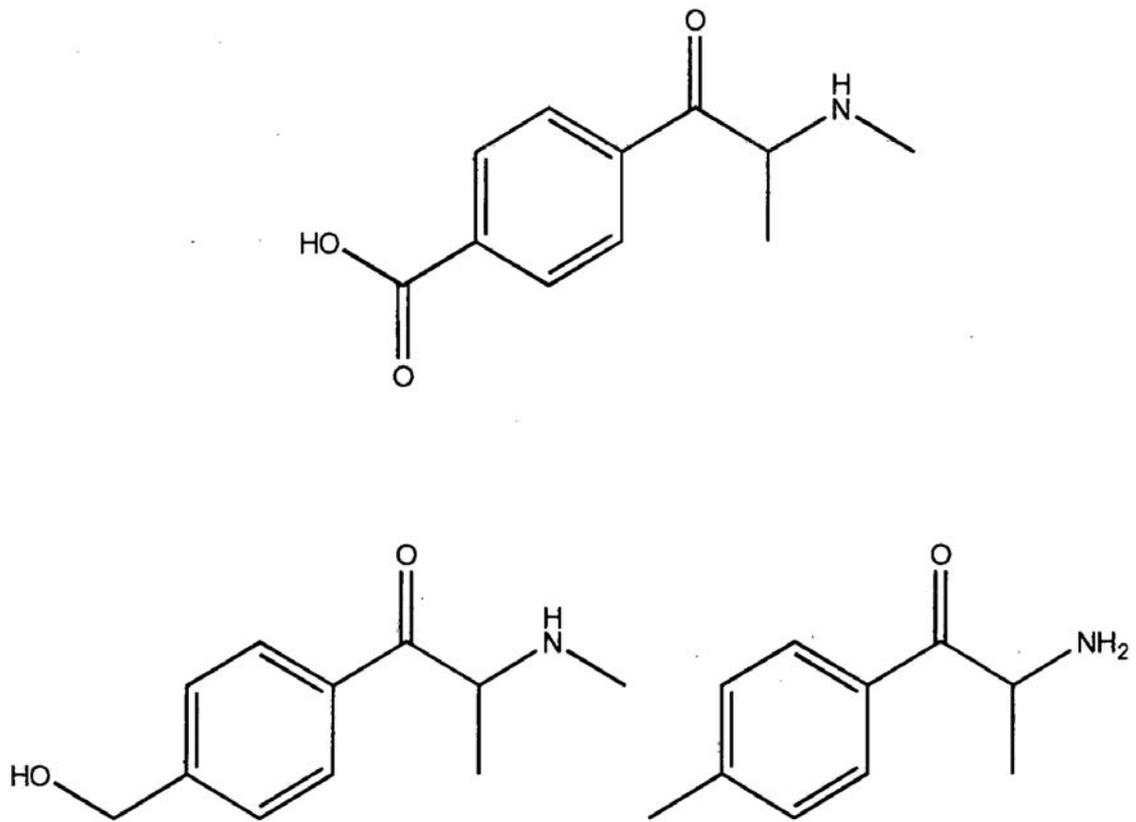


Figura 2

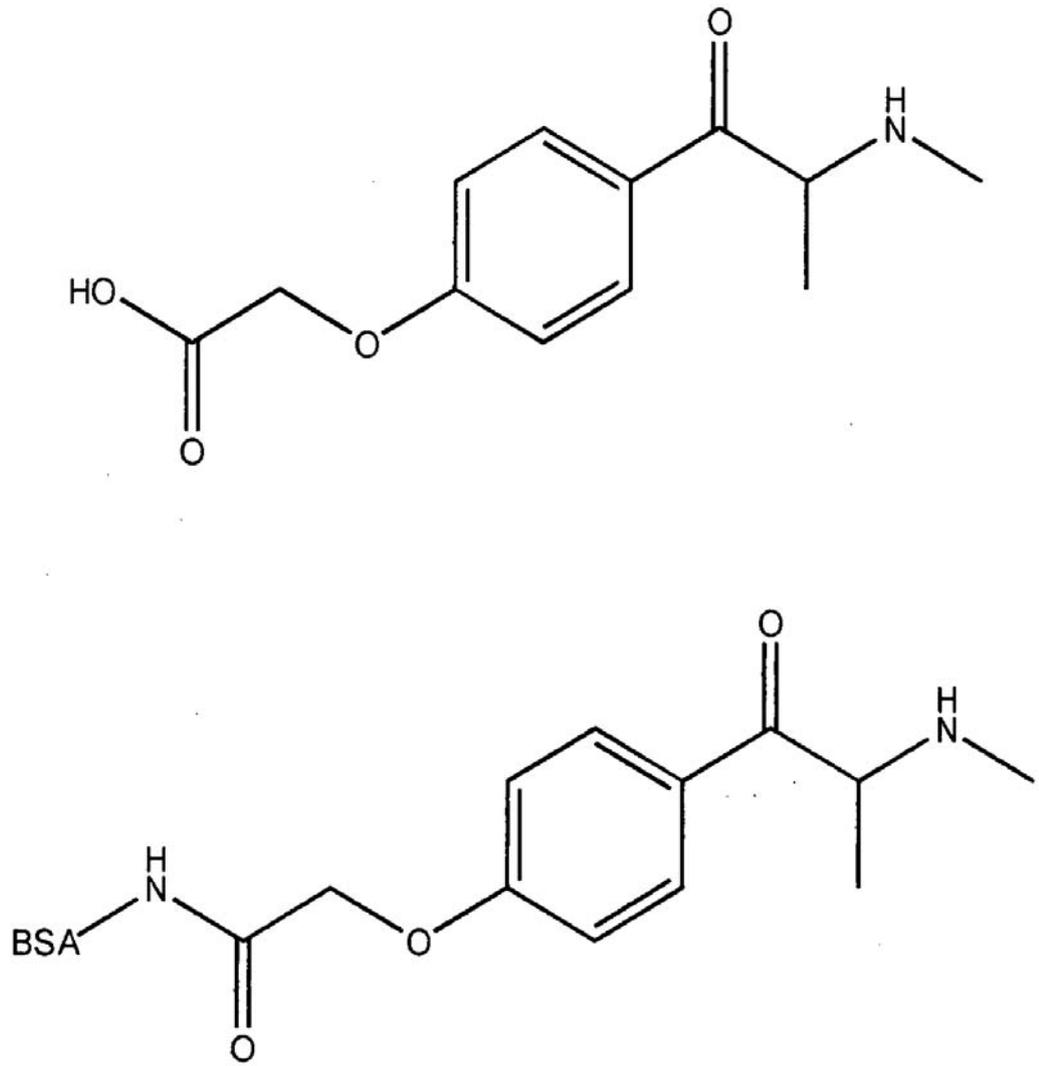


Figura 3 Hapteno 1 (Arriba) e Inmunógeno (1)