

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 342**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/94** (2006.01)

**C07K 16/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2009 E 09162439 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2261259**

54 Título: **Inmunoensayo para antidepresivos basados en N-(3-clorofenil)piperazina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.12.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 525 342 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo para antidepresivos basados en N-(3-clorofenil)piperazina

**Antecedentes de la invención**

5 La trazodona, nombre sistemático 2-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-[1,2,4]triazol[4,3-a]piridin-3(2H)-ona, es un antidepresivo con una actividad ansiolítica e hipnótica que metaboliza el hígado mediante hidroxilación, N-oxidación y desalquilación, provocando esta última transformación la aparición de un metabolito importante N-(3-clorofenil)piperazina. La ingestión aguda de trazodona, cuando va acompañada de otros medicamentos, se ha asociado a toxicidad y a sobredosis mortales (por ejemplo, Balestrieri et al 1992; Goeringer et al 2000; Haria et al. 1994; de Meester et al 2001; Martínez et al 2005).

10 La nefazodona, nombre sistemático 2-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-5-etil -4-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazol-3-ona, es un medicamento antidepresivo que se ha asociado a reacciones adversas de carácter hepático y a mortalidad, así como al síndrome de serotonina (Mayol et al 1994; John et al 1997). La N-(3-clorofenil)piperazina se detecta en la orina a las veinticuatro horas de haber tomado nefazodona, pero la mayor parte de los metabolitos en la orina son metabolitos de nefazodona sin la estructura N-(3-clorofenil)piperazina. El principal metabolito de la nefazodona es el  
15 1-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-4-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazol-3,5-diona (Punit et al 1996). Entra otras N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas cabe destacar etoperidona, mepiprazol, cloperidona y mefeclorazina.

El potencial de provocar efectos adversos o fatales en personas que lo toman, o que tienen acceso a trazodona y nefazodona, exige la necesidad de llevar a cabo una toxicología clínica y forense para su detección y determinación, utilizando métodos analíticos prácticos y poco costosos. Entre los métodos analíticos que han sido utilizados para  
20 detectar y determinar trazodona, nefazodona y sus metabolitos, cabe citar la HPLC, HPLC-MS, GC, GC-MS y electrodos molécula-selectivos. La N-(3-clorofenil)piperazina tomada para fines no medicinales, incluidos sus métodos de detección, se analiza en la publicación encargada por el EMCDDA (2007).

Las reacciones específicas de uniones, como por ejemplo las interacciones anticuerpo-antígeno, se han utilizado  
25 ampliamente en los inmunoensayos para detectar una variedad de sustancias presentes en las muestras biológicas. Comparados con los métodos tales como la HPLC y GC-MS, estos métodos son menos costosos, no requieren personal especializado y se pueden realizar en entornos fuera del laboratorio, como por ejemplo en una varilla. Por ello, se pueden utilizar radioinmunoensayos (RIA) para la determinación de trazodona, nefazodona y moléculas compuestas o que  
30 contengan estructuras N-(3-clorofenil)piperazina o N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas como la mepiprazola y la etoperidona. Los radioinmunoensayos son muy sensibles, pero requieren trazadores de radionucleidos, como por ejemplo <sup>125</sup>I y <sup>3</sup>H. Los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) son una alternativa no radioactiva que se podría utilizar para su determinación cualitativa y cuantitativa. No existen RIA o ELISA para la trazodona, nefazodona o ninguna  
35 otra molécula compuesta por estructuras N-(3-clorofenil)piperazina o N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas, o que contenga las mismas. De Boer et al (2001) investigan el análisis de diversas estructuras (es decir, moléculas que no contienen la estructura N-(3-clorofenil)piperazina) 1-benzilpiperazina (BZP), 1-(4-metoxifenil)piperazina, ni 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina utilizando varias técnicas analíticas, incluidos los inmunoensayos que se comercializan para las anfetaminas. En uno de los inmunoensayos se observó una muy baja reactividad cruzada a altas concentraciones de BZP.

Para poder detectar la trazodona, la nefazodona y las moléculas relacionadas con las mismas o que contengan  
40 estructuras N-(3-clorofenil)piperazina o N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazina para fines clínicos, toxicológicos y forensicos, se requiere una prueba económicamente viable, práctica, sensible y consistente. La invención aquí descrita posee estos atributos.

**Bibliografía**

- Balestrieri G. et al (1992). Br. Med. J., 304: 686.
- Goeringer K.E. et al (2000). J. Forensic Sci., 45: 850-856.
- 45 Mayol R.F. et al (1994). Drug Metab. Dispos., 22: 304-311.
- de Meester A. et al (2001). Act. Clin. Belg., 56: 258-261.
- Haria M. et al (1994). Drugs and Aging, 4: 331-335.
- Punit M.H. (1996). Br. J. Clin. Pharmacol., 41: 21-27.
- John L. (1997). Ann. Emerg. Med., 29: 287-289.
- 50 Martínez M.A. et al (2005). J. Anal. Toxicol., 29: 262-268.
- de Boer D. et al (2001). Forensic Sci. Int., 121: 47-56.

EMCDDA (2007). Anexo 1 Información Técnica: m-Clorofenilpiperazina (mCPP), informe de control Europol-EMCDDA de una nueva sustancia psicoactiva 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), ed. European Monitoring

Centre for Drugs and Drug Addiction.

Seguela P. et al. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 3888-3892.

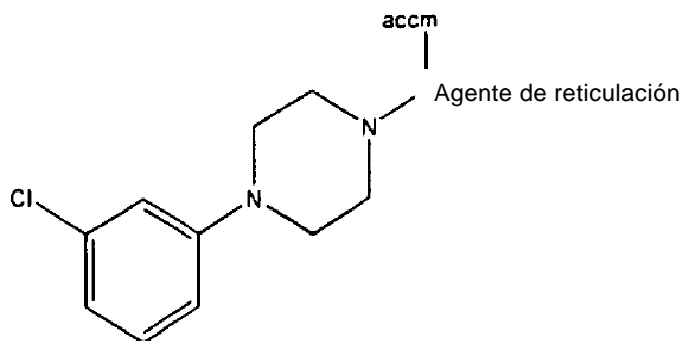
## 5 Compendio de la invención

La invención es una solución al problema de la no existencia de una prueba analítica para la trazodona, nefazodona, N-(3-clorofenil)piperazina y N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas que sea económicamente viable, práctica, sensible y consistente. La solución requiere el uso de un anticuerpo específico que se una a una N-(3-clorofenil)piperazina y N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas.

## 10 Dibujos

### Figura 1 Síntesis del hapteno 6-[N'-(3-clorofenil)-N-piperazinil]ácido hexanoico descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo que se une a un epítipo de N-(3-clorofenil)piperazina o epítipo de la estructura N-(3-clorofenil)piperazina en una N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina para detectar o determinar la N-(3-clorofenil)piperazina o las N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas en una solución o en una muestra *in vitro* tomada de un paciente. El anticuerpo se produce a partir de un inmunógeno de la estructura



donde el agente de reticulación se une al N'-átomo del anillo piperazinil al accm, un material portador que confiere antigenicidad. El agente de reticulación del inmunógeno del que se produce el anticuerpo es -X-Y- donde X es una fracción de alqueno de cadena lineal C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, más preferiblemente C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, y aún más preferiblemente C<sub>5</sub> sustituida o no sustituida, o fracción de arileno e Y (antes de la conjugación con el accm) se selecciona de un carboxi, ditiopiridilo, maleimida, amino, hidroxilo, tiol, tioéster o una fracción de aldehído, más preferiblemente una porción de carboxi. El accm puede ser cualquier material que hace que la totalidad o parte de la estructura N-(3-clorofenil)piperazina sea susceptible para la identificación del anticuerpo y la unión. Por ejemplo, el accm puede ser una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. El anticuerpo puede ser monoclonal, pero es preferible que sea policlonal. La N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina es preferentemente una o más moléculas de trazodona, nefazodona y 1-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-4-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazol-3,5-diona.

Otro aspecto de la invención es un método para detectar o determinar la N-(3-clorofenil)piperazina o N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas en una solución o una persona, método que consiste en poner en contacto una muestra *in vitro* extraída de una persona, o la solución, con un conjugado, y un anticuerpo que se une a un epítipo de N-(3-clorofenil)piperazina o un epítipo de la estructura N-(3-clorofenil)piperazina en una N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina, detectando el conjugado unido, y deduciendo de los valores de calibración la presencia de un volumen determinado de N-(3-clorofenil)piperazina o uno o más N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas. Preferiblemente la N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina es una o más moléculas de trazodona, nefazodona y 1-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-4-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazol-3,5-diona.

Otro aspecto de la invención es un kit para detectar o determinar la N-(3-clorofenil)piperazina o las N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas, incluyendo el kit un anticuerpo que se une a un epítipo de N-(3-clorofenil)piperazina o un epítipo de la estructura N-(3-clorofenil)piperazina en una N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina. Preferiblemente la N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina es una o más moléculas de trazodona, nefazodona y 1-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-4-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazol-3,5-diona. El kit puede incluir instrucciones para utilizar dichos anticuerpos con el fin de detectar o determinar la N-(3-clorofenil)piperazina o las N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas. Para los propósitos de la invención, la solución puede ser por ejemplo una solución de células cultivadas. Una solución de células cultivadas adecuadas permitiría que el ensayo *in vitro* pudiera estudiar, por ejemplo, los productos metabólicos y la actividad del medicamento.

La muestra puede ser cualquier fluido biológico periférico, pero preferiblemente sangre o suero. Los conjugados del método se componen de haptenos fijados a agentes de marcaje. Los haptenos de los conjugados son moléculas que se unen a los anticuerpos del método. El uso de haptenos, conjugados y anticuerpos dentro del marco de los inmunoensayos es muy conocido dentro de este campo. Preferiblemente, el agente de marcaje de los conjugados se selecciona a partir de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva o una mezcla de estas. Es preferible que el agente de marcaje sea una enzima, más preferible un peroxidasa y aun más preferible una peroxidasa del rábano (HRP, por sus siglas en inglés). De forma alternativa o adicional, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente.

### Métodos generales y resultados

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

Aunque los haptenos proporcionan epítomos estructurales definidos, no son en sí mismos inmunógenos y, por lo tanto, necesitan ser conjugados con materiales portadores, lo que provocará una respuesta inmunógena cuando se administra a un animal receptor. Los materiales portadores pertinentes contienen por lo general segmentos de poli(aminoácidos) e incluyen polipéptidos, proteínas y glicoproteínas. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son la albúmina 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. En particular, los carbohidratos, levaduras o polisacáridos pueden conjugarse con el hapteno para producir un antígeno. Los haptenos también se pueden acoplar a un agente de marcaje detectable como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano), una sustancia con propiedades fluorescentes o una etiqueta radioactiva para la preparación de conjugados (o reactivos de detección) para su uso en los inmunoanálisis. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado del mismo. La formación de inmunógenos implica química de conjugación convencional en la que el oxígeno del grupo hidroxilo de un hapteno A se combina primero con DCC y luego con NHS para formar un éster con un potente grupo saliente. El ataque nucleófilo sobre el carbonilo de la función éster mediante un grupo amina libre en la proteína (BSA o BTG) da lugar a un enlace amida y la formación de antígenos diana. Con el fin de confirmar que se ha conseguido la conjugación adecuada del hapteno al material portador, antes de la inmunización, cada antígeno se evalúa utilizando la técnica de espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés).

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

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

#### Preparación de antisueros

Para crear el antisuero policlonal, el inmunógeno de esta invención se mezcló con el adyuvante de Freund y la mezcla se le inyectó a un animal receptor, como un conejo, oveja, ratón, cerdo de guinea o caballo (p.ej. Seguela et al.1984, para ver el protocolo general de inmunización). Las inyecciones adicionales (refuerzos) se elaboran y se obtiene una muestra del suero para evaluar el título del anticuerpo. Cuando el título óptimo se ha alcanzado, se extrae sangre del animal anfitrión para producir un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de anticuerpos requerido depende de la aplicación prevista. En muchos casos no se requiere una purificación; sin embargo, en otros casos, como cuando el anticuerpo tiene que ser inmovilizado sobre un soporte sólido, se pueden aplicar las etapas de purificación para deshacerse del material no deseado y eliminar la unión no específica.

#### 45 Desarrollo del inmunoanálisis

El proceso de desarrollar un inmunoensayo es bien conocido por expertos en la técnica. En resumen, para un inmunoensayo competitivo en el que el análito diana es una molécula no inmunogénica tal como un hapteno, se lleva a cabo el siguiente proceso: se producen anticuerpos inmunizando a un animal, preferiblemente un animal mamífero, administrándole de forma repetida un inmunógeno. El suero del animal inmunizado se recoge cuando el título de anticuerpos es suficientemente alto. Se añade un conjugado a una muestra que contiene el análito de actuación y los anticuerpos, y el conjugado y el análito compiten por la unión a los anticuerpos. El proceso puede comprender la fijación de dichos anticuerpos de suero a un sustrato de soporte tal como un soporte sólido de poliestireno o un biochip. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. La señal emitida en el inmunoanálisis es proporcional a la cantidad de conjugado fijado a los anticuerpos, que a su vez es inversamente proporcional a la concentración del análito. La señal puede detectarse o cuantificarse comparándola con un calibrador.

Ejemplo 1: Preparación del 6-[N'-(3-clorofenil)-N-piperazinil]ácido hexanoico (hapteno B)

A una solución de etil 6-[N'-(3-clorofenil)-N-piperazinil]hexanoate (10 g, 0,029 mol) en una mezcla de THF / agua (1 / 1)

se le añadió hidróxido de potasio (12 g, 0,087 mol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El THF se eliminó mediante vacío y la solución se acidificó con HCl (2N). El precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó. La recristalización con metanol dio 6-[N'-(3-clorofenil)-N-piperazinil]ácido hexanoico (hapteno B) (6,5g). <sup>13</sup>C NMR (δ:ppm): 177,61; 152,78; 136,6; 132,15; 122,18; 118,15; 116,29; 58,21; 53,3; 47,86; 34,83; 27,43; 25,77; 25,18.

#### 5 Ejemplo 2: Conjugación de 6-(N'-(3-clorofenil)-N-piperazinil)ácido hexanoico con BSA

A una solución enfriada a 0°C de hapteno B (37,28 mg, 0,12 mmol) en DMF (3 ml) en atmósfera de nitrógeno se le añadió tri-n-butilamina (31,42 µl, 0,132 mmol) y cloroformiato de isobutilo (IBCF) (17,02 µl, 0,132 mmol). La mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos y a continuación se añadió gota a gota a una solución de BSA (100mg) en bicarbonato de sodio (100 mM, 10 ml) y la mezcla se agitó a 4°C durante la noche. A continuación, la solución se dializó contra tampón fosfato 50 mM con pH de 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C y se liofilizó. Los resultados de MALDI mostraron que 22,02 moléculas de hapteno B se habían conjugado con una molécula de BSA.

#### 15 Ejemplo 3: Conjugación de 6-(N'-(3-clorofenil)-N-piperazinil)ácido hexanoico con BTG

A una solución enfriada a 0°C de hapteno B (65,09 mg, 0,203 mmol) en DMF (3 ml) en atmósfera de nitrógeno se le añadió tri-n-butilamina (53,1 µl, 0,223 mmol) y cloroformiato de isobutilo (IBCF) (28,78 µl, 0,223 mmol). La mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos y a continuación se añadió gota a gota a una solución de BTG (150mg) en bicarbonato de sodio (100 mM, 10 ml) y la mezcla se agitó a 4°C durante la noche. A continuación, la solución se dializó contra tampón fosfato 50 mM con pH de 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C y se liofilizó.

#### 20 Ejemplo 4: Preparación del 6-[N'-(3-clorofenil)-N-piperazinil]ácido hexanoico al HRP

A una solución enfriada a 0°C de hapteno B (2 mg) en DMF (200 µl) en atmósfera de nitrógeno se le añadió tri-n-butilamina (38 µl) y cloroformiato de isobutilo (IBCF) (2 µl). La mezcla se agitó durante 10 minutos a 0° C, se añadió gota a gota a una solución enfriada de HRP (200 mg) en agua (800 µl) y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el exceso de hapteno con columnas PD-10 (Pharmacia) en serie, equilibrada previamente con PBS con pH 7,2. A continuación se dializó el conjugado hapteno-HRP por la noche con 10L de PBS con pH 7,2 a 4°C.

#### 25 Ejemplo 5: Desarrollo de ELISA para N-(3-clorofenil)piperazina y N'-sustituidas -N-(3-clorofenil)piperazinas

Trazodona y N-(3-clorofenil)piperazina se acoplaron mediante un agente de reticulación a la tiroglobulina bovina (BTG). El inmunógeno resultante se administró a ovejas adultas de forma mensual para obtener un antisuero policlonal específico. La IgG se extrajo a partir del antisuero a través de ácido caprílico/precipitación con sulfato de amonio de inmunoglobulina. Las placas de microtitulación (Thermo Scientific, 95029180) se recubrieron con el anticuerpo (125 µl) en un tampón de recubrimiento (10 mM Tris pH 8,5) a 37°C durante 2 horas. El anticuerpo fue revestido con 2,5 µg/ml. A continuación las placas se lavaron; se añadieron 50µl de la muestra/estándar (trazodona, Sigma T6154-1g; N-(3-clorofenil)piperazina, Alfa-Aesar L01772; nefazodona, Sigma N5536) a los pocillos adecuados por triplicado, seguido por 75 µl del conjugado hapteno-HRP y se incubó a 25°C durante 1 hora. A continuación se lavaron las placas y se añadieron 125 µl de TMB (Randox, 4380-15) a cada pocillo y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo con 125 µl de 0,2 M de ácido sulfúrico. La absorbancia se leyó a 450 nm con un lector de microplacas ELISA (Bio-Tek Instruments, EL340) y se calcularon las medidas. Finalmente, se determinó la especificidad y sensibilidad del anticuerpo.

#### Resultados

En los resultados del ELISA en la Tabla 1 se puede observar la amplia especificidad del anticuerpo de la invención para la N-(3-clorofenil)piperazina y N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas.

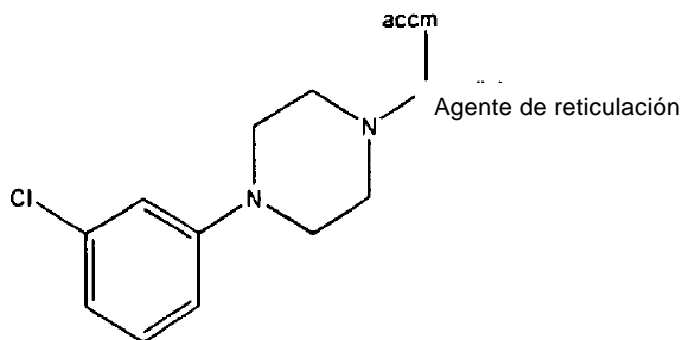
Tabla 1:

Concentración estándar ng/ml	Trazodona		mCPP		Nefazodona	
	A <sub>450</sub>	%B/B <sub>0</sub>	A <sub>450</sub>	% B/B <sub>0</sub>	A <sub>450</sub>	%B/B <sub>0</sub>
0,000	2,184	100	2,133	100	2,023	100
0,156	1,456	67	1,821	85	1,850	91
0,313	1,271	58	1,679	79	1,671	83
0,625	1,041	48	1,534	72	1,467	73
1,250	0,763	35	1,380	65	1,168	58
2,500	0,551	25	1,183	55	0,923	46
5,000	0,398	18	1,027	48	0,683	34
10,000	0,287	13	0,888	42	0,494	24
IC <sub>50</sub>	0,532		8,476		3,901	
%CR	733		46		100	

5 A<sub>450</sub> =absorbancia a 450 nm; B = absorbancia a 450 nm a x ng/ml concentración estándar B<sub>0</sub> = absorbancia a 450 nm a 0 ng/ml concentración estándar; IC<sub>50</sub> = concentración estándar que produce 50% B/B<sub>0</sub>; %CR = porcentaje de reactividad cruzada basado en 100% de especificidad a nefazodona.

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo utilizado para detectar o determinar N-(3-clorofenil)piperazina y N'-sustituidas-N-(3-clorofenil)piperazinas en una solución o en una muestra *in vitro* tomada de un paciente, que se caracteriza por haber sido producida a partir de un inmunógeno de estructura I y además también se caracteriza por ser capaz de unirse a un epítipo de N-(3-clorofenil)piperazina o la fracción N-(3-clorofenil)piperazina de una N'-sustituida N-(3-clorofenil)piperazina.



Estructura I, donde "accm" es la abreviatura de material portador que confiere antigenicidad.

2. El anticuerpo de la Reivindicación 1 en el que el agente de reticulación del inmunógeno a partir del cual se produce el anticuerpo es -X-Y- donde X es una fracción de alqueno de cadena lineal C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, más preferiblemente C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, y aún más preferiblemente C<sub>5</sub> sustituida o no sustituida, o fracción de arileno e Y (antes de la conjugación con el accm) se selecciona de un carboxi, ditiopiridil, maleimida, amino, hidroxil, tiol, tioéster o una fracción de aldehído, más preferiblemente una fracción de carboxi.
3. El anticuerpo de la Reivindicación 1 o 2 en la que la N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina es una o más moléculas de trazodona, nefazodona y 1-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-4-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazol-3,5-diona.
4. Un método para detectar o determinar la N-(3-clorofenil)piperazina y N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas en una persona o una solución, el método consistente en poner en contacto una muestra *in vitro* tomada de una persona o una solución con un conjugado y el anticuerpo de las Reivindicaciones 1 o 2, detectando el conjugado unido y deduciendo de los valores de calibración la presencia de un determinado volumen de N-(3-clorofenil)piperazina o una o más N'-sustituidas N-(3-clorofenil)piperazinas.
5. El método de la Reivindicación 4 en la que la N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina es una o más moléculas de trazodona, nefazodona y 1-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-4-(2-fenoxietil)- 1,2,4-triazol-3,5-diona.
6. Un kit para detectar o determinar la N-(3-clorofenil)piperazina y las N'-sustituidas- N-(3-clorofenil)piperazinas. El kit incluye el anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2.
7. El kit contiene la Reclamación 6 en la que la N'-sustituida- N-(3-clorofenil)piperazina es una o más moléculas de trazodona, nefazodona y 1-{3-[4-(3-clorofenil)-1-piperazinil]propil}-4-(2-fenoxietil)- 1,2,4-triazol-3,5-diona.

Figura 1

