

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 599**

51 Int. Cl.:

C07D 209/56 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 17/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2012 E 12154614 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2487155**

54 Título: **Detección de cannabinoides sintéticos**

30 Prioridad:

21.06.2011 GB 201110425

14.02.2011 GB 201102544

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

24.04.2015

73 Titular/es:

RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)

Ardmore, 55 Diamond Road

Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB

72 Inventor/es:

INNOCENZI, PAUL;

BENCHIKH, ELOUARD;

FITZGERALD, PETER;

LOWRY, PHILIP y

MCCONNELL, IVAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 534 599 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).

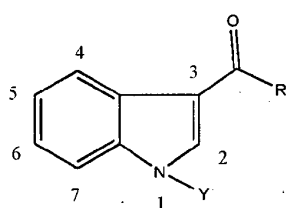
DESCRIPCIÓN

Detección de cannabinoides sintéticos

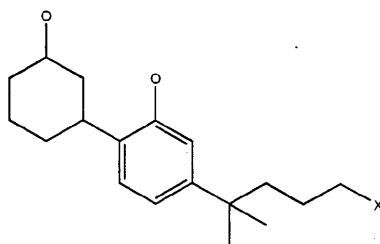
5 **Antecedentes**

El aumento creciente en el uso de drogas encubiertas (drogas sintéticas novedosas que previamente estaban, o permanecen, sin caracterizar analíticamente/estructuralmente y sin clasificar por instituciones gubernamentales), se ejemplifica mediante productos cannabinoides sintéticos que incorporan JWH-018 y/o CP 47.497 como principio activo. Los fabricantes de drogas cannabinoides sintéticas encubiertas (SSC) pueden basar su elección de diana molecular activa en estudios de la bibliografía científica que abordan el potencial terapéutico de agonistas y antagonistas de CB₁ (el receptor de cannabinoides del SNC). Mediante la incorporación de compuestos novedosos, sin caracterizar analíticamente, con alta afinidad por el receptor CB₁ en mezclas de hierbas (envasadas con nombres tales como Spice, Yucatan Fire) los fabricantes pueden dirigirse legalmente a los consumidores de drogas promocionando clandestinamente el material como producto terapéutico herbal. Un problema para los gobiernos y las agencias de lucha contra la droga es que incluso tras identificar y prohibir un nuevo cannabinoide sintético, los fabricantes pueden reaccionar rápidamente a la prohibición incorporando un análogo activo diferente en el mismo producto herbal o uno diferente; pequeños cambios específicos en la estructura molecular del compuesto activo conocido pueden preservar la actividad del receptor pero a menudo producen una molécula cuyo perfil de CG-EM/CL-EM (las técnicas de detección aplicadas comúnmente) es completamente diferente del de la molécula activa original. Así, la nueva molécula activa permanece inicialmente sin identificar y es preciso un estudio químico-analítico adicional y costoso, y que requiere muchos recursos para permitir la caracterización estructural. Los principales principios activos destacados en los productos SSC hasta la fecha son JWH-018, CP 47.497 y JWH-073 (Uchiyama *et al.* 2010; Hudson *et al.* 2010; Dresen *et al.* 2010). Los estudios iniciales del metabolismo de compuestos de tipo JWH y CP han destacado procesos metabólicos similares al metabolismo del tetrahidrocannabinol (THC), concretamente hidroxilación, carboxilación y glucuronidación del sustituyente de anillo y alquilo. Tal como se describe en el presente documento, a menos de indicarse otra cosa, JWH se refiere a moléculas que comprenden la estructura I que son activas frente a CB₁ o metabolitos del compuesto original activo frente a CB₁, en las que el sistema de anillo de indol está presente como un grupo heterobiccíclico condensado, es decir, no forma parte de, por ejemplo, un sistema de anillo heterotricíclico condensado. Y puede ser hidrógeno o un grupo alquilo sustituido o no sustituido tal como butilo, pentilo o 2-(morfolin-4-il)etilo, mientras que R es un átomo de carbono que puede formar parte de un anillo aromático, condensado o no condensado, sustituido o no sustituido, o una cadena de alquilo, alqueno o alquino sustituida o no sustituida unida opcionalmente a un anillo aromático, condensado o no condensado, sustituido o no sustituido, pero es habitualmente un anillo de naftilo sustituido o no sustituido.

CP se refiere a moléculas de cannabinoide sintético que comprenden la estructura II bicíclica no condensada II, en la que X es etilo, *n*-propilo o *n*-butilo así como metabolitos de los mismos.



Estructura I



Estructura II

Los metabolitos de indolilo, naftilo, carboxialquilo, N-desalquilado y de N-alquilo mono-, di- y tri-hidroxilado, así como sus conjugados glucuronidados son metabolitos de JWH-018 notificados (Sobolevsky *et al.* 2010; Kraemer *et al.* 2008). Moller *et al.* (2010) destacaron los mismos metabolitos que Sobolevsky *et al.* (2010), siendo la cadena de N-alquilo monohidroxilado el metabolito de fase I más abundante; Wintermeyer *et al.* (2010) realizaron un estudio *in vitro* que confirmó en gran medida los resultados previos. Se han analizado productos terapéuticos herbales usando extracción con disolventes, derivatización previa y finalmente análisis mediante CG-EM en modo SIM (Rana *et al.* 2010). Este método es inadecuado para la detección de SSC de tipo JWH y CP futuros y “actuales” (resulta concebible que los productos terapéuticos herbales “actuales”, así como JWH-018 y CP 47.497, incorporen SSC de tipo JWH y CP que aún no se han caracterizado), y requiere la derivatización previa de la muestra, personal especializado para su implementación y equipos caros. El documento EP0736529 A1 da a conocer un método para detectar metabolitos del tetrahidrocannabinol usando anticuerpos contra dichos cannabinoides en inmunoanálisis. Para abordar el problema asociado con la detección económica y rápida de moléculas de tipo JWH y CP conocidas y sus metabolitos y/o metabolitos futuros y asociados basándose en las familias de drogas de tipo JWH y CP, los inventores diseñaron un método novedoso basado en anticuerpos novedosos producidos a partir de inmunógenos novedosos. Los anticuerpos respaldan una solución analítica y económica eficaz para la detección y cuantificación de moléculas activas frente a CB₁ de tipo JWH y CP actuales y futuras en muestras de pacientes *in vitro* y productos terapéuticos herbales.

Bibliografía

Dresen *et al.* (2010). J. Mass Spectrom., 45: 1186-1194.

Kraemer *et al.* (2008). http://www.gtfch.org/cms/images/stories/media/tk/tk76_2/abstractsvortraege.pdf

Hudson *et al.* (2010). J. Anal. Toxicol., 34: 252-260.

Moller *et al.* (2010). Drug Test Anal. 24 de sep. [publicación electrónica avance de la edición impresa].

Rana *et al.* (2010). Quantitative composition of synthetic cannabinomimetics in “Herbal High” products. Póster en SOFT 2010 Annual Meeting, Richmond, Virginia, EE.UU.

Sobolevsky *et al.* (2010). Foren. Sci. Int., 200(1-3): 141-147.

Uchiyama *et al.* (2010). Foren. Sci. Int., 198: 31-38.

Wintermeyer *et al.* (2010). Anal. Bioanal. Chem., 398: 2141-2153.

Documento EP 0 736 529

Sumario de la invención

La invención describe un método rápido y práctico para la detección y determinación de cannabinoides sintéticos conocidos y/o encubiertos basados en las familias de drogas de tipo JWH y CP. También se describen kits y su uso para la detección y determinación de SSC de tipo JWH y CP en productos terapéuticos herbales y muestras de pacientes *in vitro*. La invención está respaldada por inmunógenos y anticuerpos novedosos que facilitan dichos métodos, kits y aplicaciones.

Dibujos

Figura 1 Síntesis de hapteno A

Figura 2 Síntesis de hapteno B

Figura 3 Síntesis de hapteno C

Figura 4 Síntesis de hapteno D

Figura 5 Inmunógenos I, II y III

Figura 6 Moléculas representativas de la familia JWH

Figura 7 Metabolitos de tipo JWH identificados e hipotéticos (n = 1-2). Los metabolitos hidroxilados potencialmente se metabolizan además al/a los glucurónido(s) correspondiente(s)

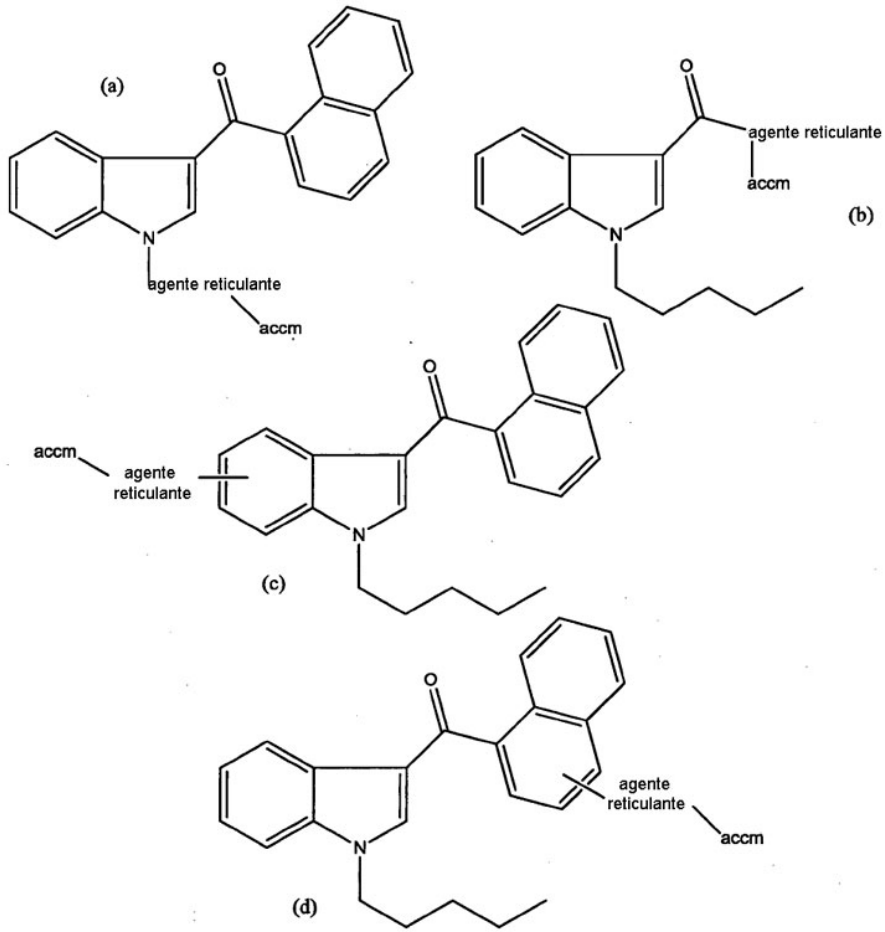
Figura 8 Moléculas activas frente a CB₁ de la familia CP

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona inmunógenos, anticuerpos, métodos, kits, usos y sustratos sólidos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

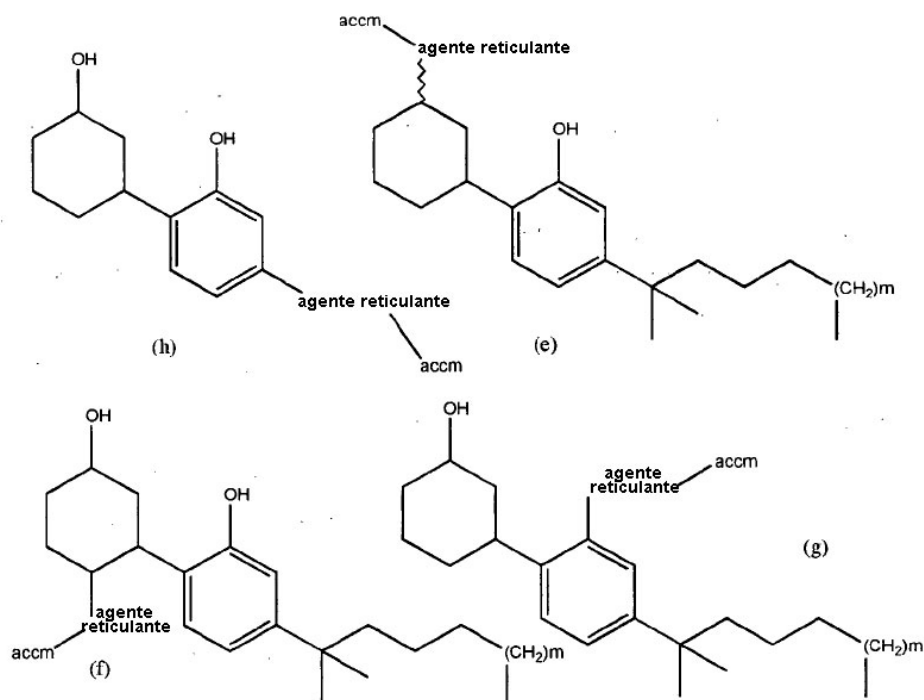
5

Un primer aspecto de la invención es uno o más inmunógenos que presentan las siguientes estructuras



10

Grupo I (a)-(d) (inmunógenos de la familia JWH)



Grupo II (e)-(h) (inmunógenos de la familia CP)

5 en las que el accm es un material portador que confiere antigenicidad; el agente reticulante es un grupo de unión funcionalizado que une el accm a la parte restante de la molécula. Por funcionalizado quiere decirse que el agente reticulante incorpora átomos que le permiten unirse tanto al accm como al resto de tipo JWH o CP, formando un grupo de unión en puente. En la estructura (e), el agente reticulante forma un enlace sencillo o uno doble con el anillo de ciclohexano, en la estructura (c) el agente reticulante se extiende desde la posición 4, 5, 6 ó 7 del anillo de indol y en la estructura (d) el agente reticulante se extiende desde la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 del anillo de naftilo. El concepto de agente reticulante lo conoce bien el experto en la síntesis de inmunógenos. Para la presente invención, cuando se conjuga el hapteno con el accm para formar el inmunógeno, la naturaleza y longitud del agente reticulante sigue métodos convencionales para optimizar el reconocimiento epitópico de haptenos por el anticuerpo. Esto conlleva un agente reticulante de baja inmunogenicidad y una longitud de cadena preferiblemente no mayor de aproximadamente diez átomos, lo más preferiblemente no mayor de seis átomos.

Preferiblemente para la estructura (a), el agente reticulante es $-(CO)_n-D-Y-$, y, donde $n = 0$ ó 1 , y D es un resto alquileo o arileno, de cadena lineal, sustituido o no sustituido C_{1-10} , preferiblemente C_{1-5} e Y, que se une al accm, se selecciona de grupos tales como carbonilo, amino, tiol, maleimida, isocianato, isotiocianato, aldehído, diazo y ditiopiridilo. Preferiblemente Y es carbonilo o amino. Preferiblemente para las estructuras (b), (c), (d), (f) y (h), el agente reticulante es $-(A)_n-D-Y-$ donde $A = O, -N(R)-, S, -S(O)-$ (sulfóxido) o $-S(O)_2-$ (sulfonilo) y $R = H$ o alquilo C_{1-5} , $n = 0$ ó 1 y D es un resto alquileo o arileno, de cadena lineal, sustituido o no sustituido C_{1-10} , preferiblemente C_{1-5} e Y, que se une al accm, se selecciona de grupos tales como carbonilo, amino, tiol, maleimida, isocianato, isotiocianato, aldehído, diazo y ditiopiridilo. Preferiblemente Y es carbonilo o amino.

Preferiblemente para la estructura (e), $m = 1-3$, el agente reticulante es $-(L)_p-M-Q-$ o $=N-O-M-Q-$ en los que Q, unido al accm, es carbonilo o amino, M es un resto alquileo o arileno, de cadena lineal, sustituido o no sustituido C_{1-10} , preferiblemente C_{1-5} , $p = 0$ ó 1 y L es O, NH, S, éster, tioéster o amida.

Preferiblemente para la estructura (g), $m = 1-3$, el agente reticulante es $-(L)_p-M-N-$ en el que N, unido al accm, es carbonilo o amino, M es un resto alquileo o arileno, de cadena lineal, sustituido o no sustituido C_{1-10} , preferiblemente C_{1-5} , $p = 0$ ó 1 y L es O, NH, S, éster, tioéster o amida. Inmunógenos preferidos corresponden a las estructuras (a) y (c). El agente reticulante de estructura (c) del grupo I se une preferiblemente en la posición del 5-indol. El agente reticulante de estructura (d) del grupo I se une preferiblemente en la posición del 4-naftilo. Se ha encontrado que inmunógenos de la invención producen anticuerpos que pueden unirse a varias moléculas de tipo JWH y sus metabolitos. El experto es consciente de que para que estos anticuerpos reconozcan moléculas de tipo JWH y CP deben unirse a estructuras o epitopos particulares de hapteno (en este contexto, siendo el hapteno aquella parte del inmunógeno que no es el agente reticulante ni el accm); los epitopos son a menudo grupos diferentes que incorporan grupos funcionales. Por ejemplo, con referencia al inmunógeno de tipo JWH de estructura

(a) del grupo I, el epítipo reconocido por el anticuerpo será la totalidad o parte del resto 3-(1-naftoil)-1H-indol, y para un inmunógeno de estructura (b) del grupo I, el epítipo reconocido por el anticuerpo será la totalidad o parte del resto N-pentil-3-carbonil-1H-indol. El accm puede ser cualquier material que hace que la totalidad o parte de hapteno sea susceptible de reconocimiento y unión por parte del anticuerpo. Por ejemplo, el accm puede ser una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. Inmunógenos especialmente preferidos de la invención corresponden a las estructuras (a) y (c) del grupo I en las que la estructura (a) tiene Y = carbonilo, n = 0 y D = pentileno y la estructura (c) tiene Y = carbonilo, A = O, n = 1 y D = metileno.

Un aspecto adicional de la invención es un anticuerpo producido contra un inmunógeno de estructura (a), (b) o (c) del grupo I, que puede unirse a moléculas de la familia JWH y sus metabolitos que comprenden la estructura I. El término "que puede unirse a", tal como se usa en el presente documento, no implica que los anticuerpos tengan la elección de unirse o no a las moléculas de tipo JWH, sino que en condiciones de inmunoanálisis convencionales, los anticuerpos se unirán a las moléculas de tipo JWH o CP. Los anticuerpos se producen preferiblemente contra inmunógenos de estructura (a) o (c) del grupo I, pudiendo unirse los anticuerpos a varias moléculas y metabolitos de la familia JWH, incluyendo JWH-018 y sus metabolitos hidroxilados de N-alquilo. Se prefiere especialmente que los anticuerpos se produzcan a partir de la estructura (a) del grupo I en la que Y = carbonilo, n = 0 y D = pentileno y la estructura (c) del grupo I en la que Y = carbonilo, A = O, n = 1 y D = metileno, los anticuerpos pueden unirse a varias moléculas y metabolitos de la familia JWH, incluyendo JWH-018 y sus metabolitos desalquilados, hidroxilados y carboxilados, JWH-073, JWH-081, JWH-200 y JWH-398. Los anticuerpos también tienen el potencial de unirse a derivados activos frente a CB₁ de moléculas de tipo JWH que podrían representar futuras generaciones de SSC.

La invención también describe un anticuerpo producido contra un inmunógeno de estructura (d), (e), (f) o (g), pudiendo unirse el anticuerpo a moléculas de la familia CP, metabolitos de moléculas CP y futuras moléculas de SSC que comprenden la estructura II. Cuando se usa en referencia a un anticuerpo, la palabra específico en el contexto de la presente invención se refiere al analito que se une preferiblemente por el anticuerpo, tal como se mide mediante una métrica adecuada como la CI₅₀. Dada la CI₅₀ de diversos analitos, pueden calcularse sus reactividades cruzadas. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal usando métodos bien conocidos. Si el anticuerpo policlonal presenta la especificidad y sensibilidad requeridas, es decir, se une a un único analito dentro del intervalo de detección del ensayo, es innecesario el desarrollo de un anticuerpo monoclonal. Alternativamente, podría ser deseable un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a varios analitos; en el contexto de la presente invención, se prefieren anticuerpos que se unen a varios analitos. Pueden incorporarse uno o más anticuerpos de la invención en un kit para la detección y determinación de SSC individuales o múltiples. El experto en el campo del inmunodiagnóstico conoce varios formatos de inmunoanálisis alternativos que podrían incorporar los anticuerpos de la invención en disolución o acoplados (por ejemplo unidos covalentemente o "no unidos" electrostáticamente a través de fuerzas de van der Waals) a un sustrato sólido tal como perlas, portaobjetos de vidrio/plástico o chips cerámicos (por chip se entiende un sustrato pequeño, plano). Un sustrato sólido preferido sobre el que se unen covalentemente los anticuerpos de la invención es un chip, preferiblemente de cerámica; la palabra "biochip" puede usarse para referirse a un chip con anticuerpos unidos. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para la detección o determinación de un único SSC tal como JWH-018, como la molécula original o como un metabolito, pero una realización preferida es el uso de uno o más anticuerpos, preferiblemente dos o más anticuerpos, al menos uno derivado del grupo I y uno derivado del grupo II, para la detección o determinación de varios SSC y/o sus metabolitos de las familias JWH y CP. Los criterios de detección y determinación para un SSC usando una plataforma de inmunoanálisis incluyen, tal como se conoce bien en la técnica, superar un valor de concentración/punto de corte predefinido o medir el valor equivalente de calibración tal como se deriva de una curva de calibración (también denominada curva patrón).

Otro aspecto de la invención es un método de detección o determinación de cannabinoides sintéticos de las familias JWH y/o CP y sus metabolitos en una muestra *in vitro* de un individuo o en una disolución derivada de una sustancia sospechosa de contener cannabinoides sintéticos que comprende: poner en contacto la muestra o disolución con uno o más agentes de detección y uno o más anticuerpos de la invención que se unen a moléculas de la familia JWH y/o uno o más anticuerpos de la invención que se unen a moléculas de la familia CP, medir los agentes de detección, y detectar o determinar, mediante referencia a calibradores, la presencia o concentración de una molécula o moléculas de la familia JWH y/o la familia CP. Con referencia a "detectar o determinar", "detectar" significa analizar cualitativamente la presencia o ausencia de una sustancia, "determinar" significa analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia. El agente de detección es una molécula pequeña, generalmente de estructura similar a una molécula que va a detectarse conjugada con un agente marcador, que puede unirse a uno de los anticuerpos de la invención. El agente marcador se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radiactiva o una mezcla de las mismas. Preferiblemente, el agente marcador es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, lo más preferiblemente peroxidasa del rábano picante (HRP). Alternativa o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente. Para los fines de la invención, la muestra de paciente que va a usarse para el análisis *in vitro* puede ser cabello o un líquido biológico periférico pero es preferiblemente sangre completa, suero, plasma u orina.

Preferiblemente, los cannabinoides sintéticos que van a detectarse o determinarse son uno o más de JWH-018, JWH-073, JWH-200 y JWH-398 y el uno o más anticuerpos se derivan de inmunógenos de estructuras (a) y (c) del grupo I. Cuando se hace referencia a la detección o determinación de una molécula de JWH o CP, con o sin un

número como sufijo unido a JWH y CP, también se infieren el metabolito o metabolitos a menos que se indique otra cosa. El inmunógeno de estructura (a) tiene preferiblemente un agente reticulante -X-Y- en el que Y es carbonilo y se une al accm, y X es pentileno, y el inmunógeno de estructura (c) tiene un agente reticulante -O-CH₂-C(O)- en el que el carbonilo se une al accm.

5 La invención también describe kits para detectar o determinar una molécula o moléculas de la familia JWH y/o la familia CP que comprenden uno o más anticuerpos de la invención. Preferiblemente, el kit comprende uno o más anticuerpos producidos frente a un inmunógeno de cualquiera de las estructuras (a), (b), (c) o (d) del grupo I y uno o más anticuerpos producidos frente a un inmunógeno de estructura (d), (e), (f) o (g) del grupo II. Más preferiblemente los anticuerpos del kit se derivan de un inmunógeno de estructura (a) y/o (c). Se prefiere particularmente un kit que comprende anticuerpos derivados de los inmunógenos I o II (figura 5) para detectar o determinar uno o más de JWH-018, JWH-073, JWH-200 y JWH-398. Los anticuerpos del kit se acoplan preferiblemente a cualquier soporte sólido adecuado tal como un chip. Aunque el soporte sólido puede ser de cualquier forma adecuada tal como una perla o un portaobjetos y de cualquier material adecuado tal como silicio, vidrio o plástico, el soporte sólido es preferiblemente un chip de cerámica. El kit puede incluir además calibradores y uno o más agentes de detección e incluye opcionalmente instrucciones de uso de los anticuerpos del kit y, si están incorporados, los calibradores y agentes de detección, para detectar y determinar moléculas de las familias JWH y/o CP. La invención también realiza soportes sólidos que comprenden los anticuerpos novedosos.

20 Los anticuerpos de la invención se usan para la detección o determinación de moléculas de tipo JWH y/o CP en mezclas de hierbas, una muestra *in vitro* tomada de un individuo o cualquier otra sustancia sospechosa de contenerlos. Un uso preferido de los anticuerpos de la invención es su uso en la detección y/o cuantificación de JWH-018, JWH-073, JWH-200 y JWH-398 en mezclas de hierbas y/o JWH-073, JWH-200, JWH-398 y JWH-018 y sus metabolitos en muestras *in vitro* tomadas de individuos.

25 **Métodos generales, ejemplos y resultados**

Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

30 Aunque los haptenos proporcionan epítopos estructurales definidos, no son en sí mismos inmunógenos y, por tanto, es necesario conjugarlos con materiales portadores, que provocarán una respuesta inmunoégena cuando se administren a un animal anfitrión. Los materiales portadores apropiados contienen comúnmente segmentos de poli(aminoácido) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteína. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles son albúmina sérica bovina (BSA), ovoalbúmina de huevo, gamma-globulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KLH) etc. Alternativamente, pueden emplearse poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, como pueden emplearse otros materiales poliméricos sintéticos o naturales portadores de grupos funcionales reactivos. También, pueden conjugarse con el hapteno hidratos de carbono, levaduras o polisacáridos para producir un inmunógeno. Los haptenos también pueden acoplarse a un agente marcador detectable tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa del rábano picante), una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o un marcador radiactivo para la preparación de agentes de detección para su uso en los inmunoanálisis. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado del mismo. La formación del inmunógeno para la invención descrita en el presente documento implica química de conjugación convencional. Para confirmar que se ha logrado una conjugación adecuada de hapteno al material portador, antes de la inmunización, se evalúa cada inmunógeno usando espectroscopía de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (EM MALDI-TOF).

Procedimiento general para el análisis de los inmunógenos mediante MALDI-TOF.

50 Se realizó la espectrometría de masas MALDI-TOF usando un espectrómetro de masas de desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Se diluyó una alícuota de cada muestra que iba a analizarse con ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1% para crear disoluciones de muestra 1 mg/ml. Se analizaron alícuotas (1 μ l) usando una matriz de ácido sinapínico y se usó albúmina sérica bovina (Fluka) como calibrante externo.

Preparación de antisueros

60 Para generar antisueros policlonales, se mezcla un inmunógeno de la presente invención con adyuvante de Freund y se inyecta la mezcla en un animal anfitrión como conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. Las ovejas son el animal anfitrión preferido. Se administran inyecciones adicionales (refuerzos) y se toman muestras del suero para determinar el título de los anticuerpos. Cuando se ha obtenido el título óptimo, se extrae sangre del animal anfitrión para producir un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de los anticuerpos requerido depende de la aplicación pretendida. Para muchos fines, no existe ningún requisito de purificación, sin embargo, en otros casos, como cuando el anticuerpo va a inmovilizarse sobre un soporte sólido, pueden emprenderse etapas de purificación para retirar el material no deseado y eliminar la unión no específica.

65

Desarrollo del inmunoanálisis

El procedimiento de desarrollar un inmunoanálisis lo conoce bien el experto en la técnica. En resumen, para un inmunoanálisis competitivo en el que el analito diana es una molécula no inmunógena tal como un hapteno, se lleva a cabo el siguiente procedimiento: se producen anticuerpos mediante la inmunización de un animal, preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno. Se recoge el suero del animal inmunizado cuando el título de anticuerpos es lo suficientemente alta. Se añade un agente de detección a una muestra que contiene el analito diana y los anticuerpos producidos, y el agente de detección y el analito compiten para unirse a los anticuerpos. El procedimiento puede comprender fijar dichos anticuerpos del suero a un sustrato de respaldo tal como un soporte sólido de poliestireno o un chip de cerámica. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales usando técnicas convencionales. La señal emitida en el inmunoanálisis es proporcional a la cantidad de agente de detección unido a los anticuerpos que, a su vez, es inversamente proporcional a la concentración de analito. La señal puede ser detectarse o cuantificarse mediante comparación con un calibrador.

15 **Ejemplos**Ejemplo - 1: Preparación de 3-(1-naftoil)-1H-indol 1

A una disolución enfriada de indol (5,85 g, 50 mmol) en éter (50 ml) bajo nitrógeno se le añadió lentamente una disolución de bromuro de metilmagnesio (3 M) en éter (17,5 ml). Tras la adición, se calentó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Luego se enfrió el nuevo hasta 0°C, y a la misma se le añadió lentamente con agitación una disolución de cloruro de 1-naftoil (9,5 g, 50 mmol) en éter (50 ml). Se calentó la mezcla resultante hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente seguido de la adición lenta de disolución saturada de cloruro amónico (375 ml). Luego se agitó la mezcla durante la noche a la temperatura ambiente. Se formó un sólido blanco que se filtró, se lavó mediante éter y se secó a alto vacío produciendo 3-(1-naftoil)-1H-indol 1 (12,3 g, 91%).

Ejemplo - 2: Preparación de N-(5-etoxicarbonilpentil)-3-(1-naftoil)-1H-indol 2

A una suspensión de hidruro de sodio (1,1 g, 30 mmol, al 60% en aceite mineral) en DMF (100 ml) bajo nitrógeno se le añadió 3-(1-naftoil)-1H-indol 1 sólido (5,43 g, 20 mmol). Tras agitación a temperatura ambiente durante 1 h, se le añadió lentamente una disolución de 6-bromohexanoato de etilo (6,6 g, 30 mmol) en DMF (10 ml) con agitación a lo largo de un periodo de 15 min y luego se calentó la mezcla a 60°C durante 3 h. Se eliminó el disolvente a alto vacío y se suspendió el producto bruto en agua (150 ml) y se extrajo mediante acetato de etilo (2x150 ml). Se lavaron las fases de acetato de etilo combinadas con agua (1x100 ml), salmuera (1x100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta la sequedad. Se purificó el producto bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando hexano/acetato de etilo (8/2) para producir el compuesto del título 2 como un aceite que se solidificó al enfriarse (7,1 g, 86%).

Ejemplo - 3: Preparación de N-(5-carboxipentil)-3-(1-naftoil)-1H-indol (hapteno A)

A una disolución de 2 (5,0 g, 12 mmol) en una mezcla de THF/H₂O (1:1) se le añadió hidróxido de potasio (1,7 g) y se agitó la mezcla a 60°C durante 1 h. Se eliminó el THF a vacío, se acidificó la disolución acuosa hasta pH 1 mediante la adición de una disolución de ácido clorhídrico (1 N) y se extrajo mediante acetato de etilo (3x100 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas mediante agua (100 ml), disolución de salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta la sequedad. Se disolvió el producto bruto obtenido en acetato de etilo (10 ml) y se precipitó el hapteno A mediante la adición de una mezcla de éter/hexano como un sólido blanco, se filtró y se secó a alto vacío produciendo el hapteno A (3,6 g, 78%).

Ejemplo - 4: Conjugación de hapteno A con BSA

A una disolución de hapteno A (52,2 mg, 0,13 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (34,0 mg, 0,16 mmol) y N-hidroxisuccinimida (19,0 mg, 0,16 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró mediante filtración la diciclohexilurea formada y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BSA (200 mg, 3,0 μmol) en disolución de bicarbonato sódico 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Luego se agitó la mezcla durante la noche a 4°C. Luego se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,2 (3 cambios) durante 24 h a 4°C, y se liofilizó. Los resultados de MALDI mostraron que se habían conjugado 9,83 moléculas de hapteno A con una molécula de BSA.

Ejemplo - 5: Conjugación de hapteno A con BTG (inmunógeno I)

A una disolución de hapteno A (58,0 mg, 0,15 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (34,0 mg, 0,16 mmol) y N-hidroxisuccinimida (19,0 mg, 0,16 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró la diciclohexilurea formada mediante filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BTG (150 mg) en disolución de bicarbonato sódico 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Luego se agitó la mezcla durante la noche a 4°C. Luego se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,2 (3 cambios)

durante 24 h a 4°C, y se liofilizó produciendo el inmunógeno I.

Ejemplo - 6: Conjugación de hapteno A con HRP

5 Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una disolución de hapteno A (2 mg) en DMF (0,2 ml). Tras mezclar, se añadió esta disolución gota a gota a una disolución de HRP (20 mg) en agua (1 ml). Se le añadió sulfo-NHS (5 mg) y se incubó la mezcla de reacción en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el exceso de hapteno con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS a pH 7,2. Luego se dializó el agente de detección hapteno-HRP durante la noche frente a
10 10 l de PBS a pH 7,2 a 4°C.

Ejemplo - 7: Preparación de 5-metoxi-3-(1-naftoil)-1H-indol 4

15 A una disolución enfriada a 0°C de 5-metoxi-1H-indol 3 (7,4 g, 50 mmol) en éter dietílico (150 ml) bajo nitrógeno se le añadió gota a gota una disolución de bromuro de metilmagnesio (3 M) en éter dietílico (17,5 ml) y se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. Luego se enfrió la disolución a 0°C y a esta disolución se le añadió una disolución de cloruro de 1-naftoil (9,5 g, 50 mmol) en éter dietílico (100 ml) gota a gota a lo largo de un periodo 15 min. Tras completarse la adición, se calentó la disolución a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h seguido de la adición lenta de disolución saturada de cloruro de amonio (375 ml) y se agitó durante la noche. Se filtró el
20 sólido blanco formado, se lavó con éter y se secó a alto vacío produciendo 5-metoxi-3-(1-naftoil)-1H-indol 4 (11,3 g, 75%).

Ejemplo - 8: Preparación de 5-metoxi-3-(1-naftoil)-N-pentil-1H-indol 5

25 A una suspensión de hidruro de sodio (1,54 g, 45,7 mmol, al 60% en aceite mineral) en DMF (100 ml) bajo nitrógeno se le añadió gota a gota una disolución de 5-metoxi-3-(1-naftoil)-1H-indol 4 (9,83 g, 32,6 mmol) en DMF (50 ml) y se agitó la mezcla a 40°C durante 1 h. Luego se enfrió la disolución hasta la temperatura ambiente y a esta mezcla se le añadió una disolución de 1-bromopentano (8,2 g, 54,3 mmol) en DMF (25 ml). Se agitó la mezcla a 60°C durante 1 h. Se eliminó el disolvente a alto vacío y se suspendió el producto bruto en agua (200 ml) y se extrajo mediante acetato de etilo (2x200 ml). Se lavaron las fases de acetato de etilo combinadas mediante agua (1x100 ml), salmuera (1x100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta la sequedad. Se purificó el producto en bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando hexano/acetato de etilo (7/3) para producir el compuesto del título 5 como un aceite que solidificó al enfriarse (7,1 g, 59%).

35 Ejemplo - 9: Preparación de 5-hidroxi-3-(1-naftoil)-N-pentil-1H-indol 6

A una disolución de ácido bromhídrico (al 48% p/p) en agua (150 ml) se le añadió 5 (6,5 g, 17,5 mmol) y se calentó la mezcla a reflujo durante 3 h. Se enfrió la disolución hasta la temperatura ambiente y se concentró hasta la sequedad. Luego se añadió agua (200 ml), se neutralizó la disolución hasta pH 7-8 y luego se extrajo con acetato de etilo (3x150 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas mediante agua (150 ml), salmuera (150 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron hasta la sequedad. Luego se recrystalizó el producto bruto en acetato de etilo/hexano produciendo un sólido blanco de 5-hidroxi-3-(1-naftoil)-N-pentil-1H-indol 6 (4,5 g, 72%).

45 Ejemplo - 10: Preparación de 5-(terc-butoxicarbonilmetoxi)-3-(1-naftoil)-N-pentil-1H-indol 7

A una suspensión de hidruro de sodio (452 mg, 13,4 mmol, al 60% en aceite mineral) en DMF (25 ml) bajo nitrógeno se le añadió gota a gota una disolución de 6 (3,7 g, 10,35 mmol) en DMF (50 ml) y se agitó la mezcla a 60°C durante 1 h. Luego se enfrió la disolución hasta la temperatura ambiente y a esta mezcla se le añadió una disolución de bromoacetato de terc-butilo (2,62 g, 13,4 mmol) en DMF (25 ml). Se agitó la mezcla a 60°C durante 3 h. Se eliminó el DMF a alto vacío y se suspendió el producto en bruto en agua (100 ml) y se extrajo la mezcla mediante acetato de etilo (2x100 ml). Se lavaron las fases de acetato de etilo combinadas mediante agua (1x50 ml), salmuera (1x50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta la sequedad. Se purificó el producto bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando hexano/acetato de etilo (9/1) produciendo el compuesto del título 7 (3,5 g, 72%).

55 Ejemplo - 11: Preparación de 5-carboximetoxi-3-(1-naftoil)-N-pentil-1H-indol (hapteno B)

A una disolución de 7 (3,0 g, 6,4 mmol) en diclorometano (50 ml) se le añadió TFA (25 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Se evaporó la mezcla hasta la sequedad y se purificó el producto bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando metanol al 5% en cloroformo produciendo el hapteno B (2,1 g, 79%).

¹³C-RMN (CD₃OD, δ ppm): 194,55, 173,21, 156,53, 141,14, 140,15, 135,25, 134,10, 131,98, 131,17, 129,46, 128,9, 1127,85, 127,44, 126,87, 125,55, 125,85, 117,92, 115,14, 112,72, 106,33, 65,54, 30,59, 29,87, 23,2, 14,25

65

Ejemplo - 12: Conjugación de hapteno B con BSA

A una disolución de hapteno B (62,4 mg, 0,15 mmol) DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (34,1 mg, 0,16 mmol) y N-hidroxisuccinimida (19,02 mg, 0,16 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró la dicitohexilurea formada mediante filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BSA (200 mg, 3 μ mol) en disolución de bicarbonato sódico 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Luego se agitó la mezcla durante la noche a 4°C. Luego se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,2 (3 cambios) durante 24 h a 4°C, y se liofilizó. Los resultados de MALDI mostraron que se habían conjugado 37,2 moléculas de hapteno B con una molécula de BSA.

Ejemplo - 13: Conjugación de hapteno B con BTG (inmunógeno II)

A una disolución de hapteno B (56,0 mg, 0,13 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (30,6 mg, 0,14 mmol) y N-hidroxisuccinimida (17,1 mg, 0,14 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró la dicitohexilurea formada mediante filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BTG (150 mg) en disolución de bicarbonato sódico 50 mM (pH 8,5) (15 ml). Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4°C. Entonces se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,2 (3 cambios) durante 24 h a 4°C, y se liofilizó dando el inmunógeno II.

Ejemplo - 14: Preparación de 3-carboxi-1-pentil-1H-indol (hapteno C)

Se añadió ácido indol 3-carboxílico (3 g, 18,62 mmol) a una suspensión de hidruro de sodio (al 60% en aceite) (1,11 g, 1,5 eq.) en DMF seca (30 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 45 min (el desprendimiento de H₂ ha cesado) y a esto se le añadió 1-bromopentano (4,62 ml, 2 eq.) en DMF seca (10 ml) gota a gota. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminaron los disolventes al vacío y al residuo se le añadió agua (30 ml) y acetato de etilo (30 ml). Se separó la parte de acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta la sequedad. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice: acetato de etilo al 20% en hexano) produciendo el compuesto del título (2,12 g, 49%) como un sólido de color crema.

Ejemplo - 15: Conjugación de 3-carboxi-1-pentil-1H-indol con BSA

A una disolución de hapteno C (26,13 mg, 0,113 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (25,64, 0,1243 mmol) y N-hidroxisuccinimida (14,30 mg, 0,1243 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró la dicitohexilurea formada mediante filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BSA (150 mg) en disolución de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,5) (9 ml). Luego se agitó la mezcla durante la noche a 4°C. Luego se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4°C, y se liofilizó.

Ejemplo - 16: Conjugación de ácido 1-pentil-1-H-indol-3-carboxílico con BTG (inmunógeno III)

A una disolución de hapteno C (31,22 mg, 0,135 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (30,74 mg, 0,149 mmol) y N-hidroxisuccinimida (17,1 mg, 0,149 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró la dicitohexilurea formada mediante filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BTG (150 mg) en disolución de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,5) (15 ml). Luego se agitó la mezcla durante la noche a 4°C. Luego se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4°C, y se liofilizó produciendo el inmunógeno III.

Ejemplo - 17: Conjugación de hapteno B con HRP

Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una disolución de hapteno B (2 mg) en DMF (0,2 ml). Tras mezclar, se añadió esta disolución gota a gota a una disolución de HRP (20 mg) en agua (1 ml). Se añadió sulfo-NHS (5 mg) y se incubó la mezcla de reacción en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el exceso de hapteno con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS a pH 7,2. Luego se dializó el agente de detección hapteno-HRP durante la noche frente a 10 l de PBS a pH 7,2 a 4°C.

Ejemplo 18 - Preparación de anticuerpos frente a los inmunógenos I y II.

Se formularon disoluciones acuosas de los inmunógenos preparados en los ejemplos 5 y 13 con adyuvante completo de Freund (FCA) para formar emulsiones que consistían en 2 mg/ml de inmunógeno 1 y 2 mg/ml de inmunógeno II en FCA al 50% (v/v). Se inmunizaron tres ovejas con cada emulsión (1^{as} inmunizaciones), inyectándose 0,25 ml por vía intramuscular en cuatro sitios en el anca de cada animal. Inmunizaciones posteriores (refuerzos 2-8) contenían 1 mg/ml de inmunógeno I y 1 mg/ml de inmunógeno II. Se emulsionaron todos los refuerzos en adyuvante incompleto de Freund (FIA) al 50% (v/v) y se administraron a las ovejas apropiadas de la misma manera que las 1^{as} inmunizaciones, a intervalos mensuales. Se tomaron muestras de sangre 7-14 días tras

cada refuerzo. Se procesó cada muestra para producir antisuero, que se purificó adicionalmente por precipitación con ácido caprílico y sulfato de amonio para producir una fracción de inmunoglobulina (Ig). Se evaluó la fracción de Ig mediante análisis en placa de microtitulación de ELISA competitivo, tal como se describe en el ejemplo 19 a continuación.

5

Ejemplo 19 - Desarrollo de ELISA competitivo para cannabinoides sintéticos de tipo JWH y sus metabolitos.

(a) Se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de unión mejorada con la fracción de Ig del antisuero producido frente al inmunógeno I (hapteno A-BTG - ejemplo 5) que se diluyó en Tris 10 mM, pH 8,5 (125 µl/pocillo). Se determinó la concentración de recubrimiento de anticuerpo apropiada usando técnicas de “tablero de ajedrez” de ELISA convencionales. Se incubó la placa durante 2 horas a 37°C, se lavó 4 veces a lo largo de un periodo de 10 minutos con solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 (TBST) y se secó a golpecitos. Se prepararon disoluciones patrón de cannabinoides sintéticos, metabolitos y moléculas seleccionadas de tipo JWH en TBST, añadiéndose 50 µl de cada una a los pocillos apropiados. A cada pocillo se le añadieron 75 µl de conjugado (hapteno A-HRP) diluido en tampón Tris que contenía EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA. También se determinó la dilución apropiada de conjugado usando técnicas de “tablero de ajedrez” de ELISA convencionales. Se incubó la placa a 25°C durante 1 hora. Se retiró el exceso de conjugado no unido lavándolo 6 veces a lo largo de un periodo de 10 minutos con TBST y se secó a golpecitos. A cada pocillo de la placa se le añadieron 125 µl de disolución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) que luego se incubó durante 15-20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se terminó la reacción añadiendo 125 µl de ácido sulfúrico 0,2 M a cada pocillo. Luego se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación.

Empleando cada serie de patrones, se generaron curvas de calibración y se usaron éstas para determinar la especificidad del inmunoanálisis para los cannabinoides sintéticos, metabolitos y moléculas seleccionadas de tipo JWH. En las tablas 1 a 3, se presentan los resultados de este estudio, calculándose la reactividad cruzada según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RC} = \text{CI}_{50, \text{JWH-018}} / \text{CI}_{50, \text{RC}} \times 100$$

donde % RC es el porcentaje de reactividad cruzada, $\text{CI}_{50, \text{JWH-018}}$ es la concentración de JWH-018 que provoca un desplazamiento de la señal del 50% y $\text{CI}_{50, \text{RC}}$ es la concentración de cannabinoide sintético/metabolito/molécula seleccionada de tipo JWH que provoca un desplazamiento de la señal del 50%.

Tabla 1: Datos generados a partir de un ensayo en placa de microtitulación competitivo para cannabinoides sintéticos de tipo JWH y sus metabolitos, empleando antisuero producido frente al inmunógeno I (hapteno A-BTG) y el conjugado (hapteno A-HRP) como reactivo de detección.

(b) De manera similar a lo descrito en el ejemplo 19(a), se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con la fracción de Ig del antisuero producido frente al inmunógeno II (hapteno B-BTG). Se empleó el conjugado (hapteno A-HRP) como reactivo de detección. En la tabla 2, se presentan los datos generados.

Tabla 2: Datos generados a partir de un ensayo en placa de microtitulación competitivo para cannabinoides sintéticos de tipo JWH y sus metabolitos, empleando el antisuero producido frente al inmunógeno II (hapteno B-BTG) y el conjugado (hapteno A-HRP) como reactivo de detección.

(c) Se empleó además el ELISA competitivo para cannabinoides sintéticos y sus metabolitos resultante para analizar muestras de orina y suero de 20 pacientes.

Resultados

50

Tabla 1 Caracterización de anticuerpos usando el antisuero producido frente al inmunógeno II y el agente de detección derivado de hapteno A en un formato de ensayo competitivo (RC basada en el 100% para JWH-018)

Analito	CI ₅₀ ng/ml	% de reactividad cruzada
JWH-018	2,11	100,00
JWH-073	1,56	135,26
JWH-398	17,55	12,02
JWH-200	1,66	127,11
3-(1-naftoil)-1H-indol	>> 40	<< 5,28
M1	5,48	38,50
M2	1,62	130,25
M3	9,16	23,03
M4	1,15	183,48
M5	0,98	215,31

>> implica un valor que muy superior al valor dado (40 ng/ml fue la mayor concentración sometida a prueba)
<< implica un valor muy por debajo del valor dado

Tabla 2 Caracterización de anticuerpos usando el antisuero producido frente al inmunógeno I y el agente de detección derivado de hapteno A en un formato de ensayo competitivo (RC basada en el 100% para JWH-018)

Analito	CI ₅₀ ng/ml	% de reactividad cruzada
JWH-018	2,71	100,00
JWH-073	0,93	291,40
JWH-398	>> 40	<< 6,78
JWH-200	0,31	874,19
3-(1-naftoil)-1H-Indol	3,84	70,57
M1	0,42	645,24
M2	0,39	694,87
M3	25,51	10,62
M4	0,18	1505,56
M5	2,04	132,84

>> implica un valor que muy superior al valor dado (40 ng/ml fue la mayor concentración sometida a prueba)
<< implica un valor muy por debajo del valor dado

5

Tabla 3 Sensibilidad y reactividad cruzada (RC) de anticuerpos producidos frente a los inmunógenos I y II de moléculas seleccionadas

Analito	Conc. de patrón. ng/ml	CI ₅₀ ng/ml	% RC
Serotonina	750,00	> 750,00	< 0,28
4-Metoxipsilocina	750,00	> 750,00	< 0,28
Delta-9-THC	750,00	> 750,00	< 0,28
Cannabinol	750,00	> 750,00	< 0,28
11-Hidroxi- δ -9-THC	750,00	> 750,00	< 0,28
CP 47.497	750,00	> 750,00	< 0,28
3-Carboxi-N-pentil-1H-indol	750,00	> 750,00	< 0,28
3-Carboxi-1H-indol	750,00	> 750,00	< 0,28
3-Carboximetil-5-hidroxi-1H-indol	750,00	> 750,00	< 0,28
5-Hidroxitriptofol	750,00	> 750,00	< 0,28

Tabla 4 Sensibilidad y reactividad cruzada (RC) de anticuerpos producidos frente a los inmunógenos I y II de JWH-018 y 1-(5-fluoropentil)indol-3-il-(1-naftil)metanona* (derivado de 5-fluoropentilo)

Inmunógeno	CI ₅₀ ng/ml	% de reactividad cruzada
I JWH-018	2,30	100,00
I Derivado de 5-fluoropentilo	0,02	11500,00
II JWH-018	1,97	100,00
III Derivado de 5-fluoropentilo	0,22	908,00

* En el documento US6900236, se detalla la unión de esta molécula al receptor CB₁

15 Los inmunoanálisis usando anticuerpos de la invención para someter a prueba posibles productos de reactividad cruzada (tabla 3) y para examinar la orina y el suero de veinte pacientes para detectar moléculas con reactividad cruzada, no revelaron ningún producto de reactividad cruzada que pudieran invalidar las mediciones tomadas usando los anticuerpos, métodos, kits y productos de la invención.

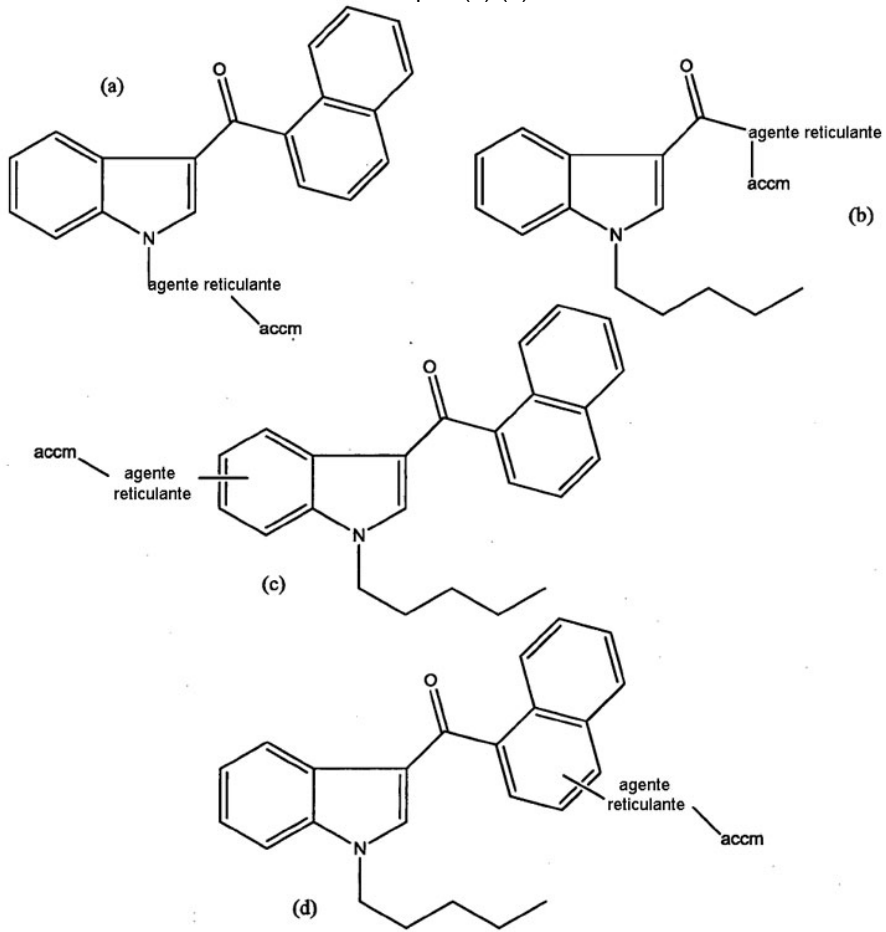
20 Tal como puede observarse en las tablas 1 a 3, se han proporcionado por primera vez anticuerpos que se unen a diversas moléculas de tipo JWH, sus metabolitos y posibles metabolitos, mientras que otras moléculas que contienen indol comunes y moléculas distintas a las de tipo JWH activas frente a CB₁ no se unen. El anticuerpo producido a partir del inmunógeno I puede unirse a moléculas de tipo JWH que se sabe que se incorporan en productos terapéuticos herbales como JWH-018, metabolitos propuestos como M2 (Wintermeyer *et al* 2010), y posibles metabolitos como M5. También está cubierta la detección y cuantificación de otros SSC de tipo JWH, los anticuerpos de la invención se unen a una variedad de moléculas que comprenden la estructura de 3-(1-naftoil)-1H-indol (por ejemplo JWH-071, JWH-398, M1, etc.). La tabla 3 confirma que los mismos anticuerpos no presentan reactividad cruzada con otras drogas psicoactivas, con moléculas presentes en muestras biológicas de pacientes que no han tomado sustancias que contienen JWH o con moléculas sin el 3-(1-naftoil)-1H-indol tales como 3-carboxi-1H-indol. En la tabla 4, se destaca el concepto de usar los anticuerpos de la invención para detectar y determinar futuros cannabinoides sintéticos encubiertos; el derivado de 5-fluoropentilo, que se sabe que se une al receptor CB₁, pero que todavía no se ha detectado en productos terapéuticos herbales o sustancias similares, se une a anticuerpos producidos a partir de los inmunógenos I y II.

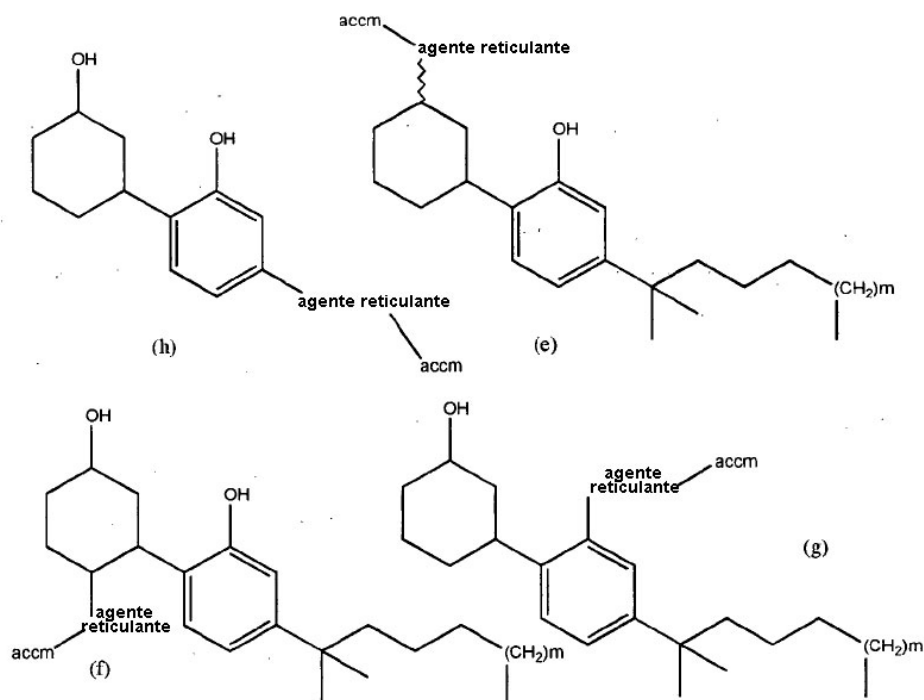
30

REIVINDICACIONES

1. Uno o más inmunógenos de las siguientes estructuras

Grupo I (a)-(d)





Grupo II (e)-(h)

5 en las que el accm es un material portador que confiere antigenicidad elegido de una proteína, un
 fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético; el agente reticulante es un
 grupo de unión funcionalizado, preferiblemente de no más de 10 átomos de cadena lineal, lo más
 10 preferiblemente de no más de 6 átomos de cadena lineal, que une el accm a la parte restante de la
 molécula, que es para las estructuras (a), (b), (c), (d), (f) y (h) -X-Y- donde Y se elige de carbonilo, amino,
 tiol, maleimida, isocianato, isotiocianato, aldehído, diazo y ditiopiridilo y se une al accm, y X para la
 estructura (a) es $-(CO)_n-D-$ donde $n = 0$ ó 1 , y D que se une a Y es un resto alquileo o arileno, de cadena
 15 lineal, sustituido o no sustituido C_{1-10} , preferiblemente C_{1-5} , y X para las estructuras (b), (c), (d), (f) y (h) es -
 $(A)_n-D-$ donde $A = O, -N(R)-, S, -S(O)-$ o $-S(O)_2-$ donde $R = H$ o alquilo C_{1-5} , $n = 0$ ó 1 , D que se une a Y es
 un resto alquileo o arileno, de cadena lineal, sustituido o no sustituido C_{1-10} , preferiblemente C_{1-5} ,
 extendiéndose el agente reticulante de estructura (c) desde la posición 4, 5, 6 ó 7 del anillo de indol;

20 para la estructura (e) $m = 1-3$ y el agente reticulante es $-(L)_p-M-Q-$ o $=N-O-M-Q-$ donde Q, que se une al
 accm, se elige de carbonilo, amino, tiol, maleimida, isocianato, isotiocianato, aldehído, diazo y ditiopiridilo, M
 es un resto alquileo o arileno, de cadena lineal, sustituido o no sustituido C_{1-10} , preferiblemente C_{1-5} , $p = 0$
 ó 1 y L es O, NH, S, éster, tioéster o amida;

25 para la estructura (g) $m = 1-3$ y el agente reticulante es $-(L)_p-M-N-$ donde N, que se une al accm, es o
 carbonilo o amino, M es un resto alquileo o arileno, de cadena lineal, sustituido o no sustituido C_{1-10} ,
 preferiblemente C_{1-5} , $p = 0$ ó 1 y L es O, NH, S, éster, tioéster o amida.

2. Inmunógeno de estructura (c) según la reivindicación 1, en el que el agente reticulante se extiende desde la
 posición 5 del anillo de indol.
3. Inmunógenos de estructuras (a) y (c) según la reivindicación 1, donde el inmunógeno (a) tiene Y =
 30 carbonilo, $n = 0$ y D = pentileno y el inmunógeno (c), donde el agente reticulante se extiende desde la
 posición 5 del anillo de indol, tiene Y = carbonilo, $A = O$, $n = 1$ y D = metileno.
4. Anticuerpo producido frente a un inmunógeno de cualquiera de las estructuras (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) o
 (h) según la reivindicación 1, donde un anticuerpo producido frente a un inmunógeno de estructura (a), (b),
 35 (c) o (d) puede unirse a un epítipo de una o más moléculas de la familia JWH, y donde un anticuerpo
 producido frente a un inmunógeno de estructura (e), (f), (g) o (h) puede unirse a un epítipo de una o más
 moléculas de la familia CP.
5. Anticuerpo según la reivindicación 4, producido frente a un inmunógeno de estructura (a), que puede unirse

a un epítopo de JWH-073, JWH-200, JWH-018, M1, M2, M3, M4 y M5.

- 5 6. Anticuerpo según la reivindicación 4, producido frente a un inmunógeno de estructura (c), que puede unirse a un epítopo de JWH-073, JWH-200, JWH-398, JWH-018, M1, M2, M3, M4, M5 y 3-(1-naftoil)-1H-indol.
- 10 7. Método de detección o determinación de cannabinoides sintéticos de las familias JWH y/o CP en una muestra *in vitro* de un individuo o en una disolución derivada de una sustancia sospechosa de contener cannabinoides sintéticos que comprende; poner en contacto la muestra o disolución con uno o más agentes de detección y uno o más anticuerpos según la reivindicación 4 producidos frente a un inmunógeno de cualquiera de las estructuras (a), (b), (c), (d), y/o uno o más anticuerpos producidos frente a un inmunógeno de estructura (e), (f), (g) o (h); detectar o determinar la cantidad del uno o más agentes de detección; y deducir por los calibradores, la presencia o la cantidad de una molécula o moléculas de la familia JWH y/o la familia CP en la muestra o disolución.
- 15 8. Método según la reivindicación 7 en el que los cannabinoides sintéticos que van a detectarse o determinarse son uno o más de JWH-018, JWH-073, JWH-200 y JWH-398 usando un anticuerpo producido frente a un inmunógeno de estructura (c).
- 20 9. Método según la reivindicación 7, en el que los cannabinoides sintéticos que van a detectarse o determinarse son uno o más de JWH-018, JWH-073 y JWH-200 usando un anticuerpo producido frente a un inmunógeno de estructura (a).
- 25 10. Método según la reivindicación 8, en el que el inmunógeno de estructura (c) tiene el agente reticulante = -O-CH₂-C(O)- en el que el carbonilo se une al accm, y el agente reticulante se une a la posición 5 del anillo de indol.
- 30 11. Método según la reivindicación 9, en el que el inmunógeno de estructura (a) tiene el agente reticulante = -X-Y- en el que Y es carbonilo y se une al accm, y X es pentileno.
- 35 12. Kit para detectar o determinar una molécula o moléculas de la familia JWH y/o la familia CP que comprende uno o más anticuerpos según la reivindicación 4.
13. Kit según la reivindicación 12, para detectar o determinar uno o más de JWH-018, JWH-073 y JWH-200 que comprende un anticuerpo según la reivindicación 5.
- 40 14. Kit según la reivindicación 12, para detectar o determinar uno o más de JWH-018, JWH-073, JWH-200 y JWH-398 que comprende un anticuerpo según la reivindicación 6.
15. Uso de uno o más anticuerpos según la reivindicación 4, para la detección y/o cuantificación de moléculas de tipo JWH y/o CP en una sustancia sospechosa de contener moléculas de tipo JWH y/o CP.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que la sustancia es una mezcla de hierbas o una muestra *in vitro* de un paciente
- 45 17. Sustrato sólido, preferiblemente un biochip, que comprende uno o más anticuerpos según la reivindicación 4.

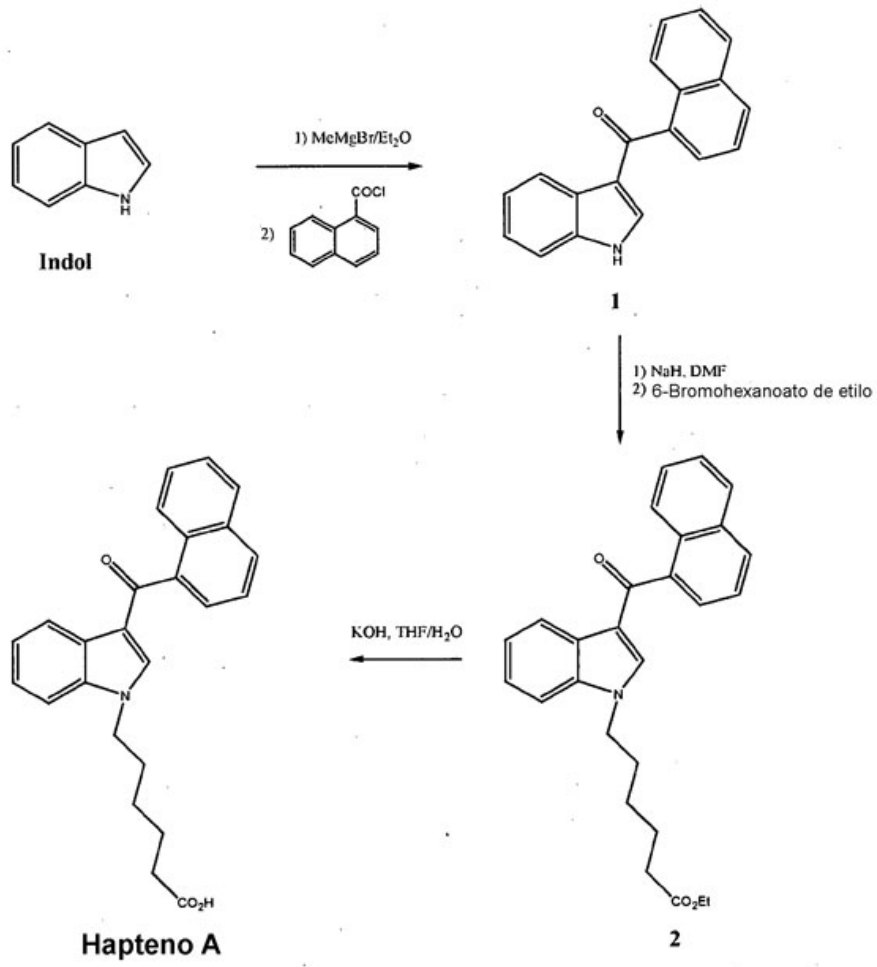


Figura 1

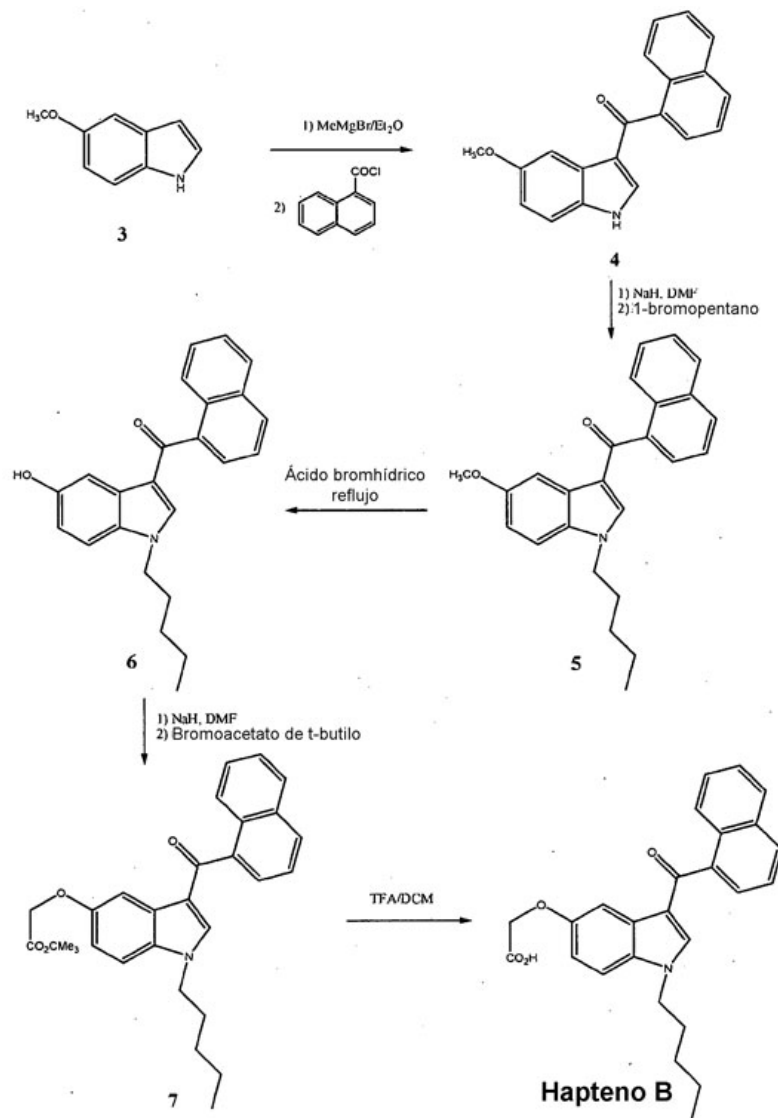


Figura 2

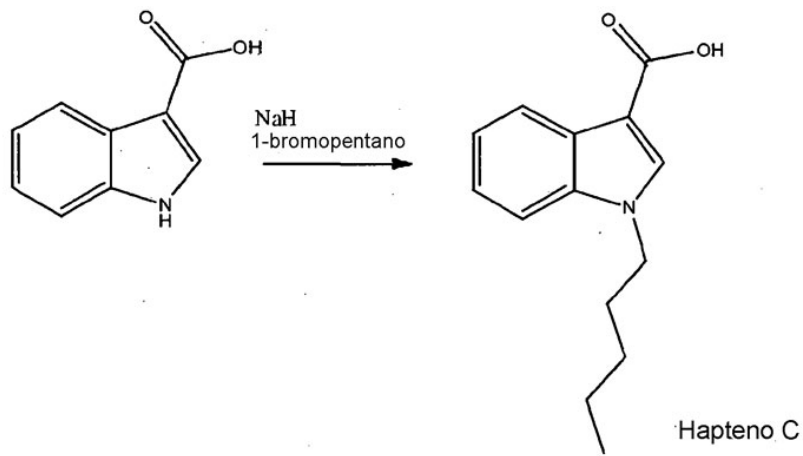


Figura 3

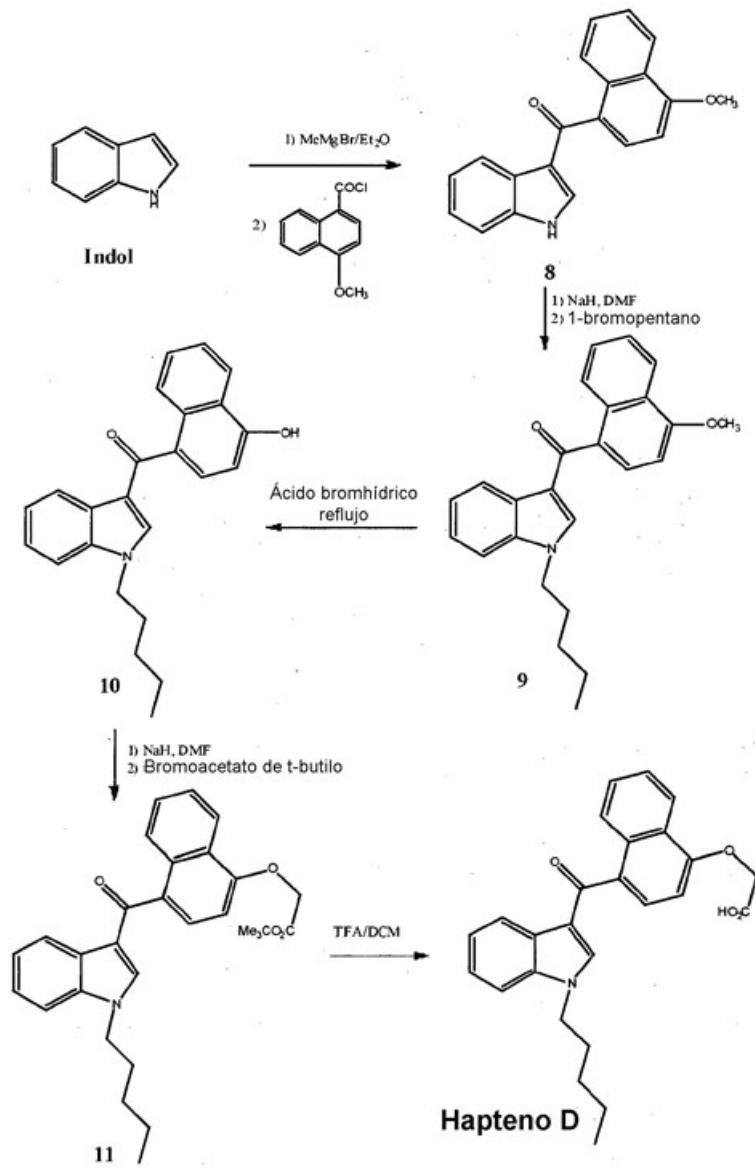


Figura 4

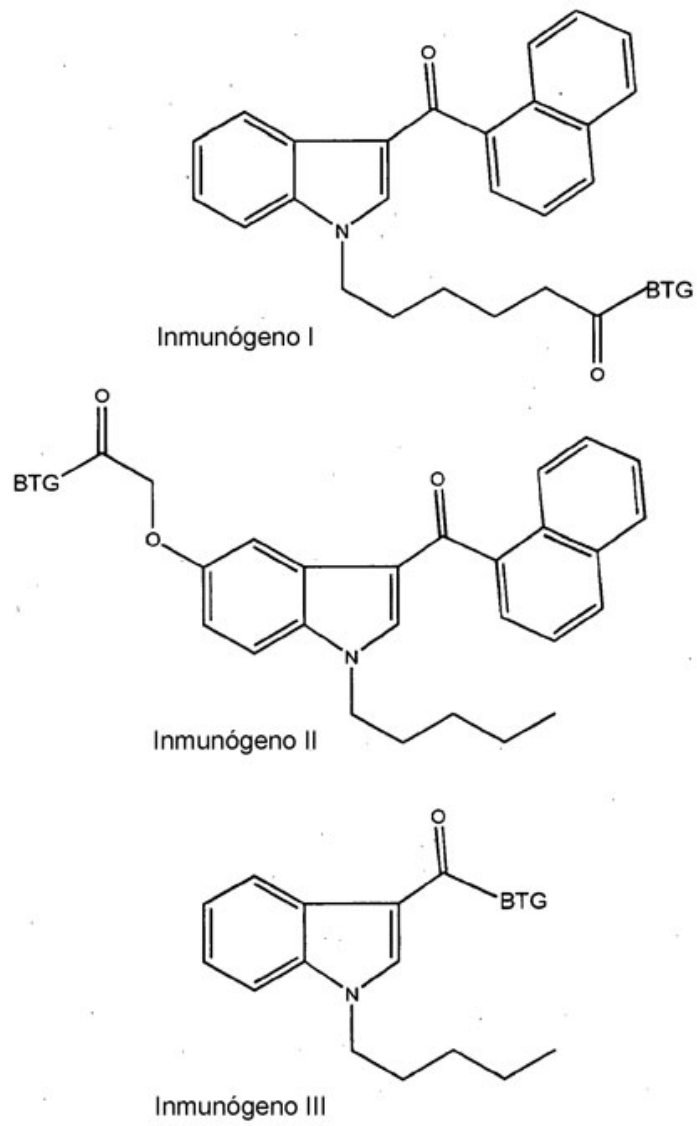


Figura 5

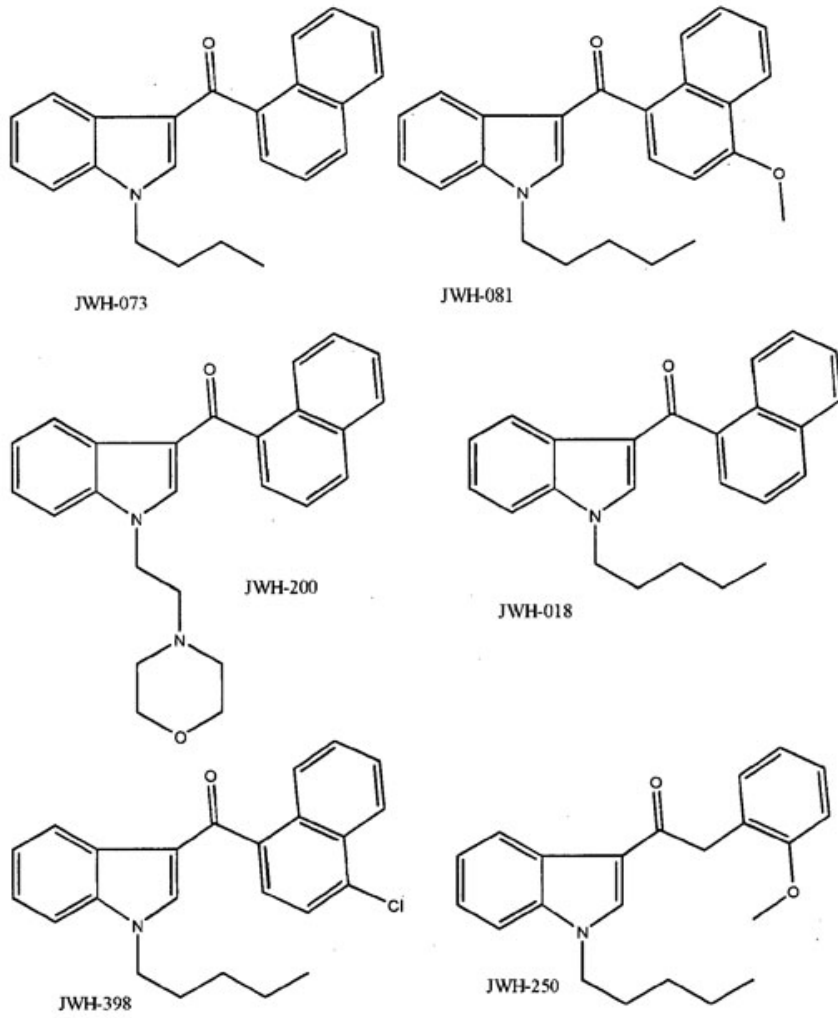


Figura 6

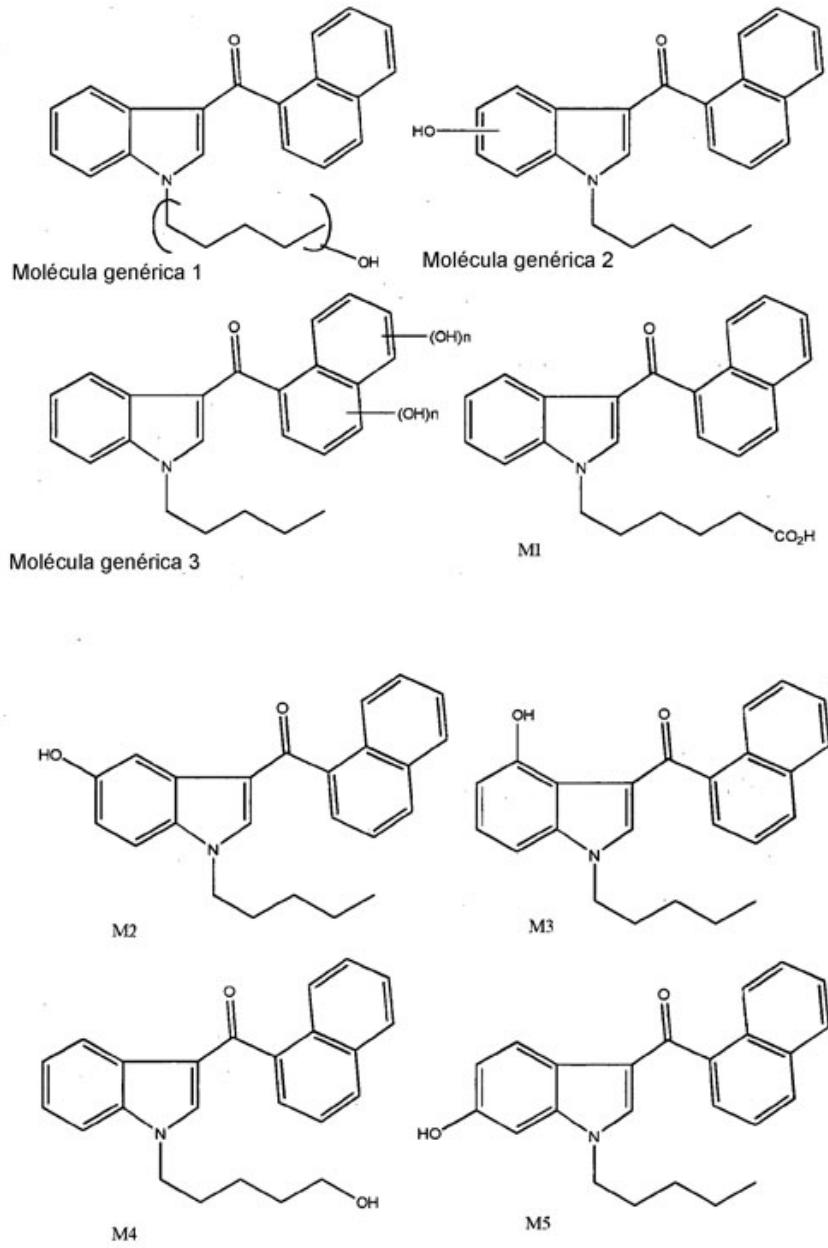


Figura 7

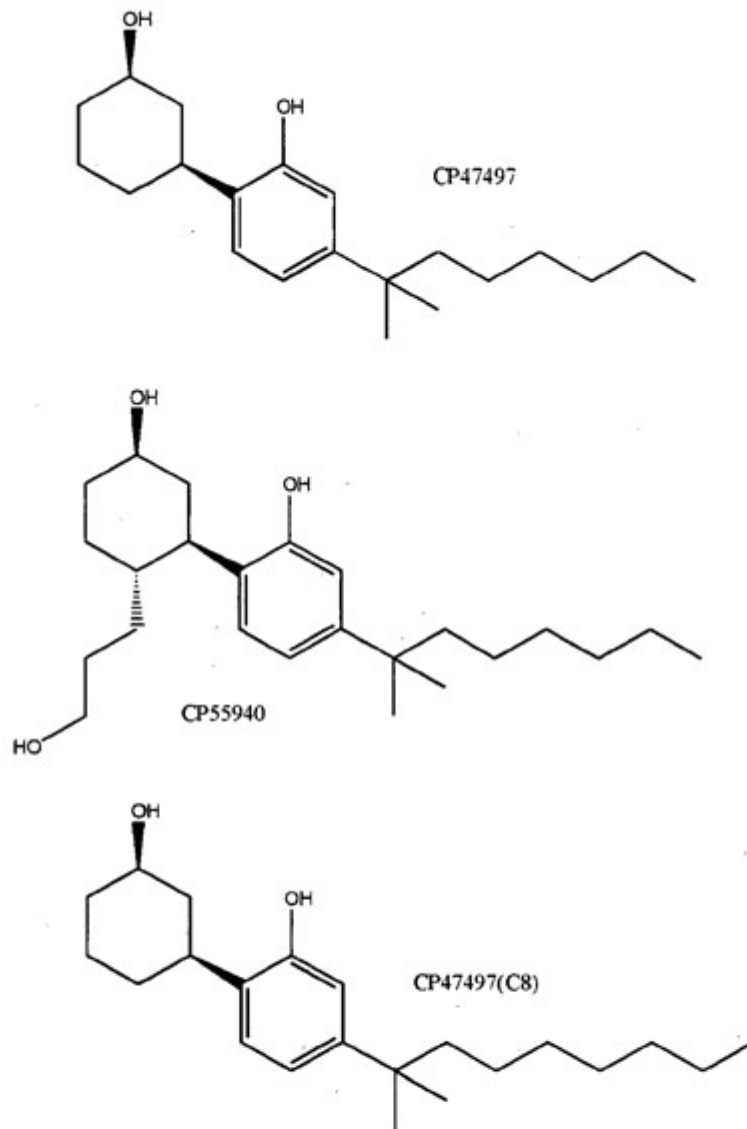


Figura 8