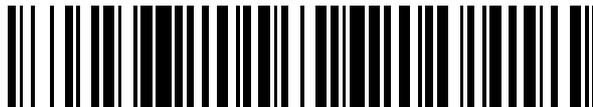


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 472**

51 Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13154614 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2626358**

54 Título: **Inmunoensayo para pirrolidinofenonas**

30 Prioridad:

09.02.2012 GB 201202223

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

21.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 554 472 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).

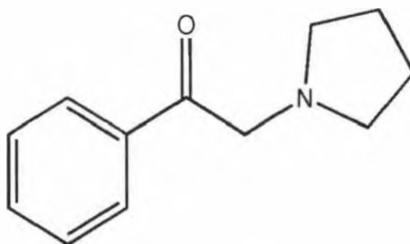
Inmunoensayo para pirrolidinofenonas

DESCRIPCIÓN

5 Antecedentes de la invención

La invención se refiere al campo de la detección analítica de pirrolidinofenonas. Las pirrolidinofenonas, normalmente clasificadas como un subconjunto de las catinonas sintéticas debido a sus similitudes estructurales, representan una clase reciente de droga psicoactiva que comprende la siguiente estructura (también denominada "subestructura").

10



Estructura I

15 Se han descrito varias pirrolidinofenonas que presentan propiedades psicoactivas incluyendo (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentan-1-ona (denominada comúnmente 3,4-metilendioxirovalerona o MDPV, molécula 25 de la figura 1) y (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(1-pirrolidinil)pentan-1-ona (denominada comúnmente pirovalerona o PVP, molécula 7 de la figura 1). La figura 1 enumera pirrolidinofenonas conocidas con propiedades psicoactivas y metabolitos propuestos. Su ingestión produce una sensación de euforia, induce un comportamiento similar a la embriaguez que afecta a la capacidad para conducir y puede dar como resultado la muerte. Existe la necesidad de detectar pirrolidinofenonas tanto antes como después de la ingestión para fines toxicológicos y legales, siendo varias moléculas de la clase ilegales o estando sometidas a un escrutinio legal en diversas jurisdicciones en todo el mundo. Se comercializan enmascaradas de diversas formas tales como alimentos vegetales, productos químicos de investigación y sales de baño que a menudo avisan de manera explícita en contra del consumo humano, un enfoque diseñado probablemente para sortear las restricciones legales para estas sustancias. Los métodos actuales de examen y confirmación usan espectrometría de masas (EM) junto con una o más de cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos (CL), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) para detectar MDPV, sus metabolitos y otras pirrolidinofenonas (por ejemplo, Yohannan y Bozenko 2010; Strano-rossi *et al.* 2010). Estos métodos necesitan muchos recursos, requiriendo equipo caro y personal altamente formado para su funcionamiento. Además, el alto número de drogas psicoactivas de pirrolidinofenonas conocidas, posiblemente desconocidas (es decir, pirrolidinofenonas que están usándose pero que aún han de caracterizarse) y futuras da como resultado compuestos con diferentes patrones de fragmentación en EM, lo que conduce a dificultades e incertidumbre en su identificación usando métodos establecidos. Por tanto, lo que se requiere es un método de detección simplista y económico que pueda enfrentarse al número extenso y creciente de sustancias psicoactivas de la clase de las pirrolidinofenonas.

35

Bibliografía

40 Yohannan J.C. y Bozenko J.S. (2010). Microgram J., 1:12-15.

Strano-Rossi S. *et al.* (2010). Rapid Commun. Mass Spectrom., 24:2706-2714.

Fitzgerald S.P. *et al.* (2005). Clin. Chem., 51: 1165-1176.

45 **Dibujos**

Figura 1. Tabla de pirrolidinofenonas psicoactivas y metabolitos (en cursiva)

Figura 2. Síntesis del hapteno A

50

Figura 3. Síntesis del hapteno B

Figura 4. RMN de C-13 del hapteno A

55 Figura 5. RMN de C-13 del hapteno B

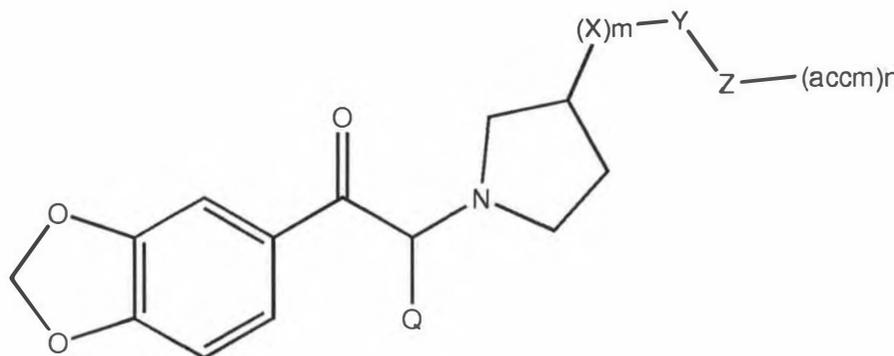
Figura 6. Curva de calibración de dosis-respuesta de MDPBP usada para determinar la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos frente a pirrolidinofenonas psicoactivas y otros compuestos psicoactivos

Sumario de la invención

En el presente documento se describe el primer inmunoensayo conocido para la detección de pirrolidinofenonas. El inmunoensayo es una técnica analítica barata, relativamente simplista. La invención describe anticuerpos, derivados de haptenos (moléculas preinmunógenas) e inmunógenos novedosos, cuyas propiedades de unión permiten la detección de varias pirrolidinofenonas psicoactivas. Los haptenos, antes de la conjugación a un grupo de reticulación, únicamente presentan un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo de pirrolidona. Este grupo hidroxilo puede unirse, usando reactivos y técnicas convencionales, inicialmente a una molécula de reticulación antes de la unión al material portador que confiere antigenicidad (accm) para formar los inmunógenos de la invención. También se describen métodos, kits y usos novedosos cada uno de los cuales comprende anticuerpos de la invención. Lo que es particularmente sorprendente y beneficioso sobre este inmunoensayo es el alto número de pirrolidinofenonas psicoactivas de diversa estructura a las que pueden unirse los anticuerpos, proporcionando un inmunoensayo de gran alcance y utilidad.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención describe haptenos e inmunógenos de fórmula I



Fórmula I

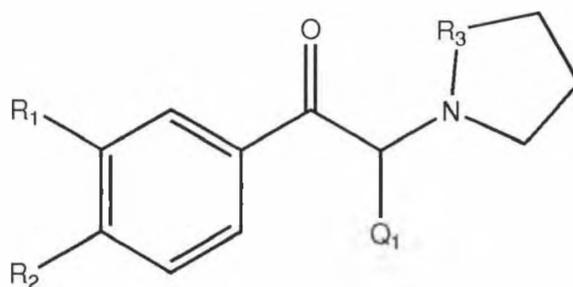
en la que,

para los haptenos $n=0$; Q es alquilo $C_1 - C_4$; X es N, O o S y $m=0$ ó 1; Y es un resto alquileo de cadena lineal $C_1 - C_{10}$ sustituido o no sustituido, más preferiblemente uno $C_1 - C_6$, lo más preferiblemente uno $C_1 - C_3$ sustituido o no sustituido; Z se selecciona de un resto carboxilo, uno ditiopiridilo, uno de maleimida, amino, hidroxilo, tiol o uno aldehído, y

para los inmunógenos $n=1$; Q es alquilo $C_1 - C_4$; X es N, O o S y $m=0$ ó 1; Y es un resto alquileo de cadena lineal $C_1 - C_{10}$ sustituido o no sustituido, más preferiblemente uno $C_1 - C_6$, lo más preferiblemente uno $C_1 - C_3$ sustituido o no sustituido; Z, antes de la conexión al accm, se selecciona de un resto carboxilo, uno ditiopiridilo, uno de maleimida, amino, hidroxilo, tiol o uno aldehído; el accm es un material portador que confiere antigenicidad.

Tanto para los haptenos como para los inmunógenos, es preferible que X sea O, Y sea $-C(O)-CH_2-CH_2-$, Z sea carboxilo o amino (para el inmunógeno, Z es carboxilo o amino antes de la conexión al accm) y Q sea preferiblemente un alquilo de cadena lineal, lo más preferiblemente o bien etilo o bien propilo. Los inmunógenos se preparan acoplando un hapteno (una molécula preinmunógena) a un material portador que confiere antigenicidad (accm) habitualmente por medio de un agente de reticulación. El accm y los agentes de reticulación son reactivos convencionales en el campo del desarrollo de anticuerpos. El accm comprende segmentos de poliaminoácidos y es preferiblemente tiroglobulina bovina (BTG), albúmina sérica bovina (BSA) o hemocianina de la lapa californiana (KLH). Alternativamente, si tiene un grupo funcional adecuado, el hapteno puede unirse directamente al accm sin el uso de un agente de reticulación. Un ejemplo de un agente de reticulación descrito en el presente documento es anhídrido succínico, activado por N,N-diciclohexilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida.

Un segundo aspecto de la invención son anticuerpos producidos frente a inmunógenos de fórmula I, pudiendo los anticuerpos unirse a al menos un epítipo estructural de una molécula de fórmula II



Fórmula II

5 en la que

Q₁ es alquilo C₁ - C₄; R₃ es -CH₂- o -C(O)-; R₁ y R₂ son H, alquilo C₁ - C₄, alcoxilo C₁ - C₄, alquilo C₁ - C₄ sustituido con hidroxilo, carboxilo o hidroxilo, o forman juntos



10

sustituidos o no sustituidos

para formar un anillo bicíclico condensado con el anillo de benceno. En realizaciones preferidas, el al menos un epitopo estructural de fórmula II al que se unen los anticuerpos es cuando el anillo bicíclico condensado no está sustituido, Q₁ es metilo, etilo o propilo y R₃ es -CH₂-. Los anticuerpos se obtienen usando métodos convencionales; se administran inmunógenos de la invención a un huésped mamífero no humano, preferiblemente una oveja, para provocar la producción de anticuerpos tras lo cual se usan los anticuerpos monoclonales o policlonales recogidos para desarrollar inmunoensayos. Otras moléculas derivadas de inmunoglobulinas adecuadas tales como fragmentos variables de cadena sencilla o de cadena corta son alternativas fácilmente aplicadas conocidas por el experto. En la figura 1 se muestran ejemplos de pirrolidinofenonas a las que se unen los anticuerpos de la invención. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención pueden unirse a al menos un epitopo estructural de las moléculas (RS)-1-(benzo[d][1,3] dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona (nombre común MDPBP), (RS)-1-(2-naftil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona (nombre común nafirona), (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona o (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona (nombre común MDPPP); las cinco drogas incorporan la estructura I en su estructura molecular. Se sabe en la técnica que para que dos moléculas diferentes puedan unirse independientemente a una proteína particular, sus estructuras deben ser similares; cualquier desviación sustancial en la estructura da como resultado una molécula con una afinidad notablemente reducida por la proteína. Esto impone un límite sobre el número de moléculas que tienen afinidad de unión sustancial por una proteína particular. Se cree que las pirrolidinofenonas se unen a las proteínas transportadoras de monoamina para serotonina, dopamina y noradrenalina, aumentando la concentración de aminas en el sistema nervioso central, dando como resultado efectos estimuladores y alucinógenos. En la figura 1 se enumeran las pirrolidinofenonas psicoactivas conocidas actualmente.

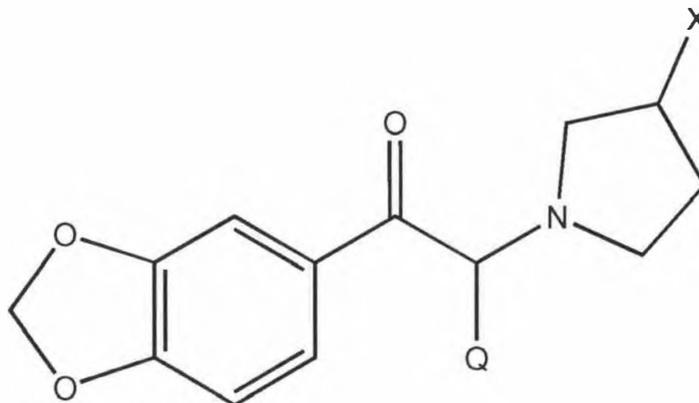
Un aspecto adicional de la invención es un método de detección o determinación de una o más pirrolidinofenonas en una muestra *in vitro* que comprende una sustancia (habiéndose opcionalmente pretratado la sustancia para lograr un estado adecuado para el análisis) comprendiendo el método poner en contacto la muestra con al menos un agente de detección y al menos un anticuerpo de la invención; detectar o determinar el/los agente(s) de detección; y deducir a partir de una curva de calibración la presencia, o cantidad, de pirrolidinofenonas en la muestra.

Preferiblemente, las pirrolidinofenonas que van a detectarse o determinarse se enumeran en la figura 1; lo más preferiblemente la una o más pirrolidinofenonas que van a detectarse o determinarse son (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(2-naftil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona y (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona. El agente de detección comprende un hapteno adecuado, preferiblemente los haptenos dados a conocer en el presente documento, unido covalentemente a un agente de marcaje detectable, pudiendo el resto de hapteno unirse a los anticuerpos de la invención. Preferiblemente, el agente de marcaje se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radiactiva, o una mezcla de las mismas. Más preferiblemente, el agente de marcaje es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, lo más preferiblemente peroxidasa del rábano (HRP). La detección implica analizar cualitativamente para determinar la presencia o ausencia de una sustancia; determinar significa analizar cuantitativamente la cantidad de sustancia. Como los anticuerpos pueden unirse a varias moléculas, el análisis cuantitativo adoptará la forma de medir la cantidad equivalente al agente de calibración. Se percibe que el principal uso del inmunoensayo de pirrolidinofenonas descrito en el presente documento, como con la mayoría de los inmunoensayos, es como herramienta de examen en la que

se detectan moléculas diana y posteriormente se identifican usando métodos basados en la espectrometría de masas. Puede usarse cualquier muestra biológica *in vitro* adecuada, pero se prefieren sangre y orina.

Un aspecto adicional de la invención es un compuesto de fórmula III

5



Fórmula III

10 en la que X es NH₂, OH o SH y Q es alquilo C₁ - C₄.

En realizaciones preferidas, X es OH y Q es etilo o propilo. También es preferible que el átomo de carbono asimétrico del anillo heterocíclico de la fórmula III sea de manera estereoespecífica de la configuración R. Los compuestos de fórmula III son moléculas intermedias hapténicas representativas que pueden conjugarse a reactivos de reticulación antes de la formación del inmunógeno.

15

Otro aspecto de la invención es un kit para la detección o determinación de pirrolidinofenonas, comprendiendo el kit al menos un anticuerpo de la invención. El kit detecta o determina preferiblemente una o más pirrolidinofenonas enumeradas en la figura 1. Lo más preferiblemente, el kit detecta o determina (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(2-naftil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona y (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona. El kit puede comprender uno o más anticuerpos de la invención y uno o más anticuerpos adicionales con diferentes especificidades moleculares; es decir, estos anticuerpos adicionales no se unen a los mismos epítomos estructurales que los anticuerpos de la invención. Una disposición de este tipo permite un enfoque multiplexado para la detección o determinación de drogas. El enfoque multiplexado hace uso preferiblemente de un sustrato plano al que se unen los anticuerpos, tal como un chip de cerámica o un portaobjetos de vidrio modificado en la superficie de manera apropiada. También pueden usarse perlas como sustrato en un enfoque monoplexado o multiplexado.

20

25

30 Métodos generales, ejemplos y resultados

Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

Aunque los haptenos proporcionan epítomos estructurales definidos, no son en sí mismos inmunógenos y por tanto necesitan conjugarse a un material portador que confiere antigenicidad (accm) que provocará una respuesta inmunógena cuando se administre a un animal huésped. Los accm apropiados contienen comúnmente segmentos de poliaminoácidos 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, BTG, hemocianina de lapa californiana (KLH), etc. Alternativamente, pueden emplearse poliaminoácidos sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, al igual que otros materiales poliméricos sintéticos o naturales que llevan grupos funcionales reactivos. Además, pueden conjugarse hidratos de carbono, levaduras o polisacáridos al hapteno para producir un inmunógeno. Los haptenos también pueden acoplarse con un agente de marcaje detectable tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa del rábano), una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o un marcador radiactivo para la preparación de agentes de detección para su uso 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 para la invención descrita en el presente documento implica química de conjugación convencional. Con el fin de confirmar que se ha logrado la conjugación adecuada de hapteno al material portador, antes de la inmunización, se evalúa cada inmunógeno usando espectroscopía de masas por desorción/ionización láser UV asistida por matriz por tiempo de vuelo (EM MALDI-TOF).

50

Procedimiento general para el análisis mediante MALDI-TOF de inmunógenos

Se realizó espectrometría de masas MALDI-TOF usando un espectrómetro de masas por desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retrasada. Se diluyó una alícuota de cada muestra que iba a analizarse en 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 agente de calibración externo.

Preparación de antisueros

Con el fin de generar antisueros policlonales, se mezcla un inmunógeno de la presente invención con adyuvante de Freund y se inyecta la mezcla en un animal huésped, tal como conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. Las ovejas son el animal huésped preferido. Se realizan inyecciones adicionales (refuerzos) y se toman muestras de suero para la evaluación del título de anticuerpos. Cuando se ha alcanzado el título óptimo, se extrae sangre del animal huésped para proporcionar un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación de los anticuerpos requerido depende de la aplicación prevista. Para muchos fines, no se requiere purificación; sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo debe inmovilizarse sobre un soporte sólido, pueden emprenderse etapas de purificación para retirar material no deseado y eliminar la unión no específica.

Desarrollo de inmunoensayo

El experto en la técnica conoce bien el procedimiento de desarrollo de un inmunoensayo. En resumen, para un inmunoensayo de competencia 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 inmunizando un animal, preferiblemente un animal mamífero, mediante administración repetida de un inmunógeno. Se recoge el suero del animal inmunizado cuando el título de anticuerpos es lo suficientemente alto. 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 por la unión a los anticuerpos. El procedimiento puede comprender fijar dichos anticuerpos séricos 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 inmunoensayo 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 detectarse o cuantificarse mediante comparación con un calibrador.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-bromobutanona

A una disolución de 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)butanona (25 g, 0,13 mol) en ácido acético (100 ml) se le añadió gota a gota una disolución de bromo (21,8 g, 0,137 mol) en ácido acético (100 ml). Entonces se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante dos horas. Se eliminó el ácido acético a alto vacío. Se añadió agua (200 ml) a la mezcla y se extrajo la disolución con diclorometano (2 x 200 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución saturada de NaHCO₃ (100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml). Se secó la disolución en diclorometano sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta sequedad a vacío. Se purificó el producto bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 5% en hexano para dar el compuesto del título (29,6 g, 84%).

Ejemplo 2: Síntesis de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((R)-3-hidroxipirrolidin-1-il)butanona

A una disolución de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-bromobutanona (7,92 g, 27,8 mmol) en acetonitrilo (100 ml) se le añadieron carbonato de potasio (7,93 g, 57,4 mmol) y (R)-(+)-3-pirrolidino (5,0 g, 57,4 mmol) y se agitó la mezcla bajo nitrógeno durante la noche a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla y se evaporó la disolución hasta sequedad. Se purificó el producto bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 50% en hexano para dar el compuesto del título como un aceite de color marrón (5,5 g, 69,2%).

Ejemplo 3: Síntesis del hapteno A

A una disolución de 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((R)-3-hidroxipirrolidin-1-il)butanona (4,5 g, 16,25 mmol) en piridina anhidra (100 ml) se le añadió anhídrido succínico (3,25 g, 32,5 mmol) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Se eliminó la piridina a alto vacío y se purificó el producto bruto de color marrón oscuro obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando metanol al 20% en cloroformo para dar el hapteno A (figura 2) como un aceite de color tostado claro (5,95 g, 97,1%).

Ejemplo 4: Conjugación del hapteno A a BSA (inmunógeno I)

A una disolución de hapteno A (42,62 mg, 0,113 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadieron N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (25,64 mg, 0,125 mmol) y N-hidroxisuccinimida (14,3 mg, 0,16 mM) 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 BSA (150 mg, 2,3 μ mol) en disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml).

Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4 °C. Se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se liofilizó para dar el inmunógeno I.

5 Los resultados de MALDI mostraron que se habían conjugado 16,58 moléculas de hapteno A a una molécula de BSA.

Ejemplo 5: Conjugación del hapteno A a BTG (inmunógeno II)

10 A una disolución de hapteno A (50,94 mg, 0,135 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadieron N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (30,64 mg, 0,150 mmol) y N-hidroxisuccinimida (17,1 mg, 0,15 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, 2,25 µmol) en disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4 °C. Se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se liofilizó para dar el inmunógeno II.

15

Ejemplo 6: Conjugación del hapteno A a HRP

20 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 la 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 hapteno en exceso con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, previamente equilibradas con PBS a pH 7,2. Entonces se dializó el conjugado de hapteno-HRP durante la noche frente a 10 l de PBS a pH 7,2 a 4 °C.

25

Ejemplo 7: Síntesis de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-bromopentanona

30 A una disolución de 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentanona (25 g, 0,12 mol) en ácido acético (100 ml) se le añadió gota a gota una disolución de bromo (25,2 g, 0,158 mol) en ácido acético (100 ml). Entonces se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante dos horas. Se eliminó el ácido acético a alto vacío. Se añadió agua (200 ml) a la mezcla y se extrajo la disolución con diclorometano (2 x 200 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución saturada de NaHCO₃ (100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml). Se secó la disolución en diclorometano sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta sequedad a vacío. Se purificó el producto bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 5% en hexano para dar el compuesto del título (30,5 g, 89%).

35

Ejemplo 8: Síntesis de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((R)-3-hidroxipirrolidin-1-il)pentanona

40 A una disolución de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-bromopentanona (10,0 g, 35,07 mmol) en acetonitrilo (100 ml) se le añadieron carbonato de potasio (10,0 g, 72,41 mmol) y (R)-(+)-3-pirrolidinol (6,3 g, 72,4 mmol) y se agitó la mezcla bajo nitrógeno durante la noche a temperatura ambiente. Entonces se filtró la mezcla y se evaporó la disolución hasta sequedad. Se purificó el producto bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 50% en hexano para dar el compuesto del título como un sólido espumoso de color marrón (6,1 g, 60,0%).

45

Ejemplo 9: Síntesis del hapteno B

50 A una disolución de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((R)-3-hidroxipirrolidin-1-il)pentanona (5,8 g, 20,0 mmol) en piridina anhidra (100 ml) se le añadió anhídrido succínico (3,0 g, 30,0 mmol) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Se eliminó la piridina a alto vacío y se purificó el producto bruto de color marrón oscuro obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando metanol al 20% en cloroformo para dar el hapteno B puro como un sólido de color tostado (5,3 g, 68,0%).

Ejemplo 10: Conjugación del hapteno B a BSA (inmunógeno III)

55 A una disolución de hapteno B (35,22 mg, 0,09 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadieron N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (20,42 mg, 0,099 mmol) y N-hidroxisuccinimida (11,39 mg, 0,099 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 BSA (150 mg, 2,3 µmol) en disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4 °C. Se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se liofilizó para dar el inmunógeno III. Los resultados de MALDI mostraron que se habían conjugado 19,63 moléculas de hapteno B a una molécula de BSA.

60

Ejemplo 11: Conjugación del hapteno B a BTG (inmunógeno IV)

65 A una disolución de hapteno B (44,22 mg, 0,113 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadieron N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (25,64 mg, 0,13 mmol) y N-hidroxisuccinimida (14,7 mg, 0,13 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, 2,25 μ mol) en disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4 °C. Se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se liofilizó para dar el inmunógeno IV.

Ejemplo 12: Conjugación del hapteno B a 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 hapteno en exceso con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, previamente equilibradas con PBS a pH 7,2. Entonces se dializó el conjugado de hapteno-HRP durante la noche frente a 10 l de PBS a pH 7,2 a 4 °C.

Ejemplo 13: Inmunoensayo de pirrolidinofenonas y moléculas seleccionadas

Se usó un analizador Evidence Investigator semiautomático (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, R.U.) como plataforma para un ensayo de biochip para la detección de pirrolidinofenonas. Se administró el inmunógeno IV a ovejas adultas mensualmente para proporcionar antisueros policlonales específicos de diana. Se extrajo IgG de los antisueros y se inmovilizó el anticuerpo purificado sobre un biochip (9 mm x 9 mm). El ensayo se basa en la competencia por sitios de unión de un anticuerpo policlonal entre conjugado de hapteno A (ejemplo 6) y pirrolidinofenonas y posibles agentes de reacción cruzada. Se inmovilizó el anticuerpo y se estabilizó sobre la superficie del biochip tal como se describió anteriormente (Fitzgerald *et al.*, 2005). Se añadió diluyente de ensayo (155 μ l), agente de calibración/pirrolidinofenona o posible agente de reacción cruzada (25 μ l) seguido por conjugado de hapteno A (120 μ l) al biochip apropiado. Entonces se incubaron los biochips durante 30 minutos a 30 °C en un termoagitador ajustado a 370 rpm. Entonces se sometieron los biochips a 2 ciclos de lavado rápidos usando el tampón de lavado proporcionado, seguido por 4 ciclos de lavado de 2 minutos. Entonces se añadieron 250 μ l de señal (luminol + peróxido 1:1, v/v) a cada biochip, y tras 2 minutos se obtuvieron imágenes del soporte de biochip en el analizador Evidence Investigator. Se generaron curvas de calibración y se usaron estas para determinar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo para detectar pirrolidinofenonas y posibles agentes de reacción cruzada. Los resultados de este estudio se presentan en la tabla 1, calculándose la reactividad cruzada según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de CR} = \text{CI}_{50 \text{ MDPBP}} / \text{CI}_{50 \text{ CR}} \times 100$$

donde % de CR es el porcentaje de reactividad cruzada, $\text{CI}_{50 \text{ MDPBP}}$ es la concentración de MDPBP que provoca un desplazamiento de la señal del 50% y $\text{CI}_{50 \text{ CR}}$ es la concentración de pirrolidinofenona/posible agente de reacción cruzada que provoca un desplazamiento de la señal del 50%.

Productos químicos

Se obtuvieron MDPBP HCl, MDPV HCl, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona HCl, nafirona HCl y MDPPP HCl del Australian Government National Measurement Institute (LGC stds); se obtuvieron MDMA y MDA de Cerilliant; se obtuvieron anfetamina, metanfetamina HCl y JWH-018 de Sigma Chemicals; se obtuvieron mescalina HCl y (+)-pseudoefedrina de Sigma Aldrich; se obtuvieron MDMA y MDA de Cerilliant; se obtuvo 1-(3-clorofenil)piperazina de Alfa Aesar; se obtuvieron salvinorina A y 1-bencilpiperazina de Aaron Chemistry; se obtuvo JWH-250 de Cayman Chemicals; se sintetizó mefedrona HCl en Randox Laboratories.

Resultados

Tabla 1 Resultados de reactividad cruzada para pirrolidinofenonas y posibles agentes de reacción cruzada (la CI_{50} de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona es de 27 ng/ml)

Sustancia	% de reactividad cruzada
(RS)-1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona HCl	192
(RS)-1-(2-Naftil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona HCl	44
(RS)-1-(4-Metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona HCl	34
(RS)-1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona HCl	100
(RS)-1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona HCl	12
(RS)-1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-metilpropan-2-amina (MDMA)	<1
D-Anfetamina	<1
(RS)-1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)propan-2-amina (MDA)	<1
Metanfetamina HCl	<1
Mescalina HCl	<1
(+)-Pseudoefedrina HCl	<1

Salvinorina A	<1
JWH-018	<1
JWH-250	<1
1-Bencilpiperazina	<1
1-(3-Clorofenil)piperazina HCl	<1
Mefedrona HCl	<1

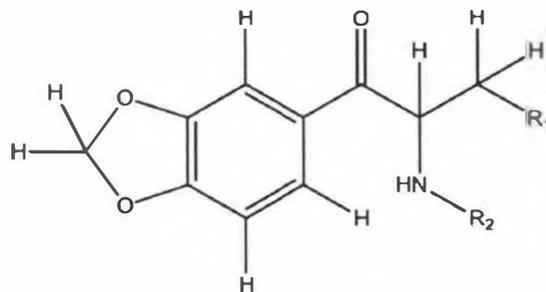
Los datos en la tabla 1 confirman que los anticuerpos de la invención se unen a pirrolidinofenonas que incorporan la subestructura representada en la estructura I mientras que no se unen a moléculas que carecen de esta subestructura.

Tabla 2 Resultados de reactividad cruzada adicionales para pirrolidinofenonas y posibles agentes de reacción cruzada

Compuesto	% de reactividad cruzada
(RS)-1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona HCl	100
(RS)-1-(4-Metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)hexanona HCl	48,4
Pirovalerona HCl	44,4
Pentilona HCl	17,4
Butilona HCl	11,4
Pentedrona HCl	<1
Metilona HCl	<1
Nor-mefedrona HCl	<1
1-Fenil-2-(1-pirrolidinil)etanona	<1
1,2-Dihidroxibenceno (catecol)	<1
N,N-dialil-5-metoxitriptamina (5-MeO-DALT)	<1
Dihidroximefedrona HCl	<1
Flefedrona HCl	<1
Prolatina	<1
Heroína	<1
Paracetamol	<1
Buprenorfina	<1
Bupropión HCl	<1
1-Bencil-4-metilpiperazina HCl monohidratado	<1
BZG	<1
(-)-Cotinina	<1
Bromhidrato de dextrometorfano monohidratado	<1
Dietilpropión HCl	<1
Etil-glucurónido	<1
Fentanilo	<1
Fluoxetina HCl	<1
7-NH-Flunitrazepam	<1
Haloperidol	<1
Hidrocodona	<1
Hidromorfona	<1
Ibuprofeno	<1
Ácido indol-3-carboxílico	<1
Lorazepam	<1
LSD	<1
Meprobamato	<1
Metadona	<1
Metacualona	<1
Metilfenidato HCl	<1
Sulfato de morfina	<1
(-)-Nicotina	<1
Maleato de (+)-norpropoxifeno	<1
(±)-Nor-ketamina HCl	<1
Norescitalopram	<1
Normeperidina	<1
Nortriptilina HCl	<1
Oxazepam	<1
Oxicodona	<1
1-(1-Fenilciclohexil)piperidina HCl (PCP HCl)	<1
Fenobarbital	<1

Sulfato de fenetilamina	<1
Psilocina	<1
Ácido salicílico	<1
Ácido salicílico	<1
Sertralina HCl	<1
(-)-11-nor-9-Carboxi-delta9-THC	<1
(-)-Delta9-THC	<1
Tramadol HCl	<1
Trazadona HCl	<1
Clorhidrato de (+/-)-3,4,5-trimetoxianfetamina (TMA)	<1
Ácido uroclorálico	<1
Zaleplón	<1
Tartrato de zolpidem	<1
Zopiclona	<1

Los anticuerpos de la invención también pueden unirse a un epitopo de moléculas de fórmula IV en la que R₁ y R₂ son independientemente metilo, etilo o propilo. Dos de tales moléculas son butilona y pentilona (tabla 2).



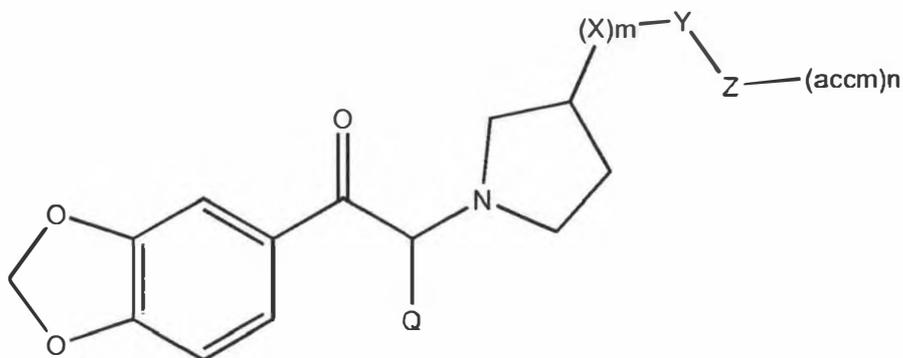
Fórmula IV

5
 10 La invención describe además un kit que comprende anticuerpos de la invención, usándose el kit para detectar o determinar moléculas que comprenden o bien la fórmula II o bien la fórmula IV; preferiblemente se usa el kit para detectar una o más de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(2-nafil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)hexanona, pirovalerona, butilona y pentilona.

15

REIVINDICACIONES

1. Hapteno o inmunógeno de fórmula I



Fórmula I

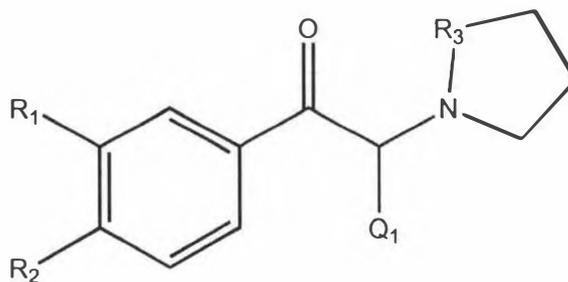
en la que,

para el hapteno $n=0$; Q es alquilo $C_1 - C_4$; X es N, O o S y $m=0$ ó 1; Y es un resto alquileo de cadena lineal $C_1 - C_{10}$ sustituido o no sustituido, más preferiblemente uno $C_1 - C_6$, lo más preferiblemente uno $C_1 - C_3$ sustituido o no sustituido; Z se selecciona de un resto carboxilo, uno ditiopiridilo, uno de maleimida, amino, hidroxilo, tiol o uno aldehido;

para el inmunógeno $n=1$; Q es alquilo $C_1 - C_4$; X es N, O o S y $m=0$ ó 1; Y es un resto alquileo de cadena lineal $C_1 - C_{10}$ sustituido o no sustituido, más preferiblemente uno $C_1 - C_6$, lo más preferiblemente uno $C_1 - C_3$ sustituido o no sustituido; Z, antes de la conexión al accm, se selecciona de un resto carboxilo, uno ditiopiridilo, uno de maleimida, amino, hidroxilo, tiol o uno aldehido; el accm es un material portador que confiere antigenicidad que comprende segmentos de poliaminoácidos.

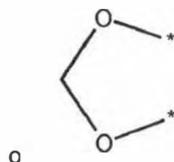
2. Hapteno o inmunógeno según la reivindicación 1, en el que para el hapteno X es O, Y es $-C(O)-CH_2-CH_2-$, Z es carboxilo o amino y Q es etilo o propilo; y para el inmunógeno X es O, Y es $-C(O)-CH_2-CH_2-$, Z es carboxilo o amino, Q es etilo o propilo y el accm es BTG, BSA o KLH.

3. Anticuerpo producido frente a un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando el anticuerpo caracterizado además por poder unirse a al menos un epítipo estructural de una molécula de fórmula II



Fórmula II

en la que Q_1 es alquilo $C_1 - C_4$; R_3 es $-CH_2-$ o $-C(O)-$; R_1 y R_2 son H, alquilo $C_1 - C_4$, alcoxilo $C_1 - C_4$, alquilo $C_1 - C_4$ sustituido con hidroxilo, carboxilo o hidroxilo, o forman juntos



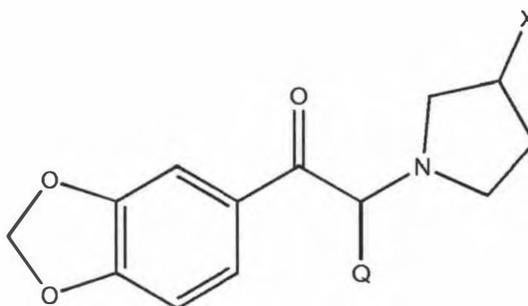
sustituidos o no sustituidos.

4. Anticuerpo según la reivindicación 3, que puede unirse a al menos un epítopo estructural de cualquiera de las moléculas (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(2-naftil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona o (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona.

5. Método de detección o determinación de una o más pirrolidinofenonas en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con al menos un agente de detección y al menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4; detectar o determinar el/los agente(s) de detección; y deducir a partir de una curva de calibración la presencia, o cantidad, de pirrolidinofenonas en la muestra.

6. Método según la reivindicación 5, en el que las pirrolidinofenonas que van a detectarse o determinarse son una o más de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(2-naftil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona y (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona.

7. Compuesto de fórmula III



Fórmula III

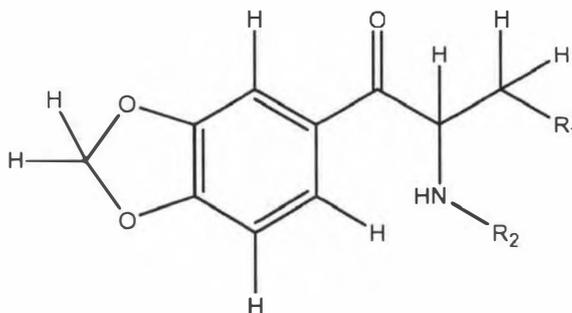
en la que X es NH₂, OH o SH y Q es alquilo C₁ - C₄.

8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que X es OH y Q es etilo o propilo.

9. Kit para la detección o determinación de pirrolidinofenonas, comprendiendo el kit al menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4.

10. Kit según la reivindicación 9 que detecta o determina una o más de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(2-naftil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona y (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona.

11. Anticuerpo producido frente a un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, estando el anticuerpo caracterizado además por poder unirse a al menos un epítopo estructural de una molécula de fórmula IV en la que R₁ y R₂ son independientemente metilo, etilo o propilo



Fórmula IV

12. Anticuerpo según la reivindicación 11, en el que R₂ es metilo y R₁ es metilo o etilo.

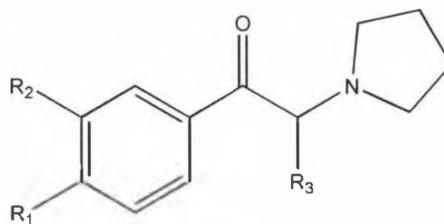
13. Kit para la detección o determinación de moléculas que comprenden estructuras de o bien la fórmula II

según la reivindicación 3 o bien la fórmula IV según la reivindicación 11, comprendiendo el kit al menos un anticuerpo derivado de un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

5 14. Kit según la reivindicación 13, para la detección o determinación de al menos una o más de (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(2-naftil)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(4-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)butanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentanona, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)propanona, (RS)-1-(4-Metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)hexanona, pirovalerona, butilona y pentilona.

10

15



Molécula	R1	R2	R3
1.	H	H	-CH ₃
2.	H	H	-CH ₂ -CH ₃
3.	H	H	-(CH ₂) ₂ -CH ₃
4.	H	H	-(CH ₂) ₃ -CH ₃
5.	-CH ₃	H	-CH ₃
6.	-CH ₃	H	-CH ₂ -CH ₃
7.	-CH ₃	H	-(CH ₂) ₂ -CH ₃
8.	-CH ₃	H	-(CH ₂) ₃ -CH ₃
9.	-O-CH ₃	H	-CH ₃
10.	-OH	-OH	-CH ₃
11.	-OH	-O-CH ₃	-CH ₃
12.	-O-CH ₃	-OH	-CH ₃
13.	-OH	-OH	-CH ₂ -CH ₃
14.	-OH	-O-CH ₃	-CH ₂ -CH ₃
15.	-O-CH ₃	-OH	-CH ₂ -CH ₃
16.	-OH	-OH	-(CH ₂) ₂ -CH ₃
17.	-OH	-O-CH ₃	-(CH ₂) ₂ -CH ₃
18.	-O-CH ₃	-OH	-(CH ₂) ₂ -CH ₃
19.	-OH	-OH	-(CH ₂) ₃ -CH ₃
20.	-OH	-O-CH ₃	-(CH ₂) ₃ -CH ₃
21.	-O-CH ₃	-OH	-(CH ₂) ₃ -CH ₃
22.			-(CH ₂) ₂ -CH ₃
23.			-CH ₃
24.			-CH ₂ -CH ₃
25.			-(CH ₂) ₂ -CH ₃

Figura 1

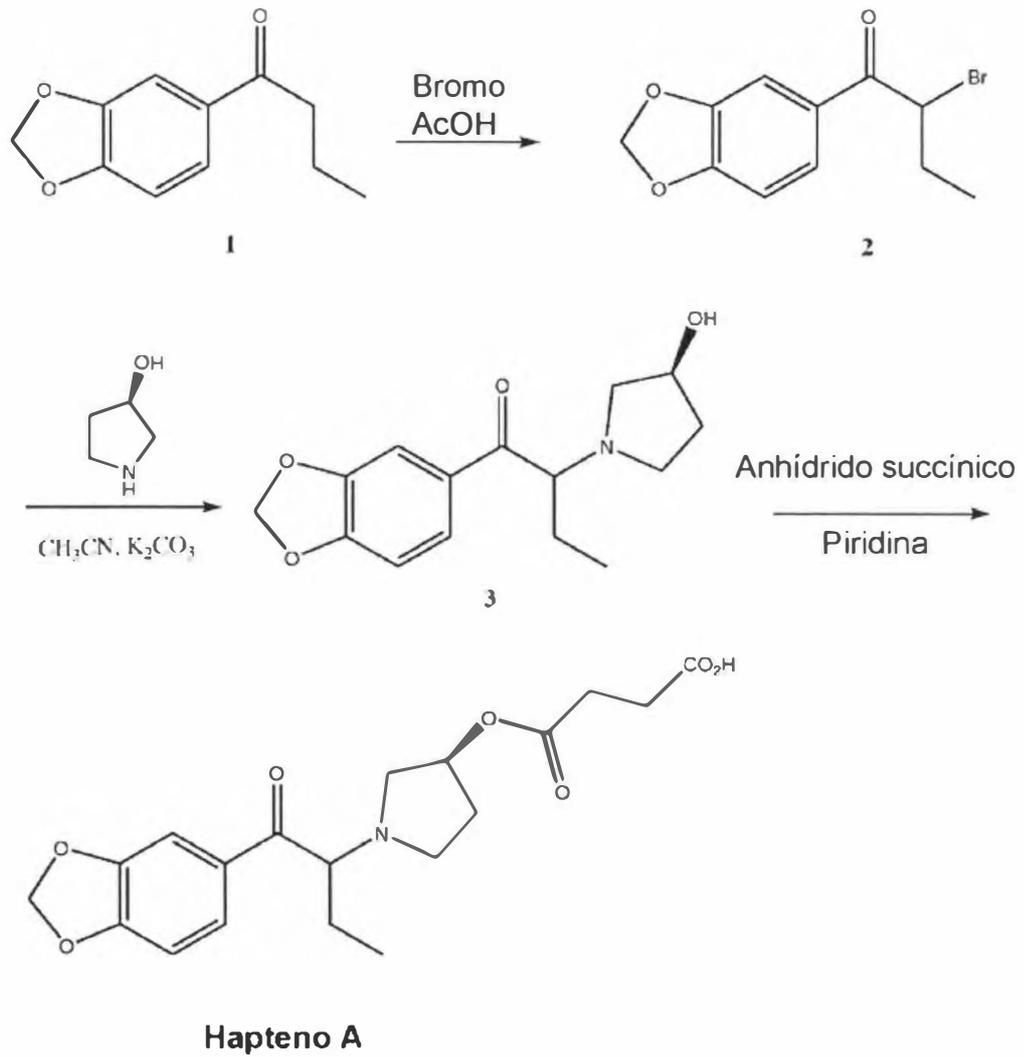


Figura 2

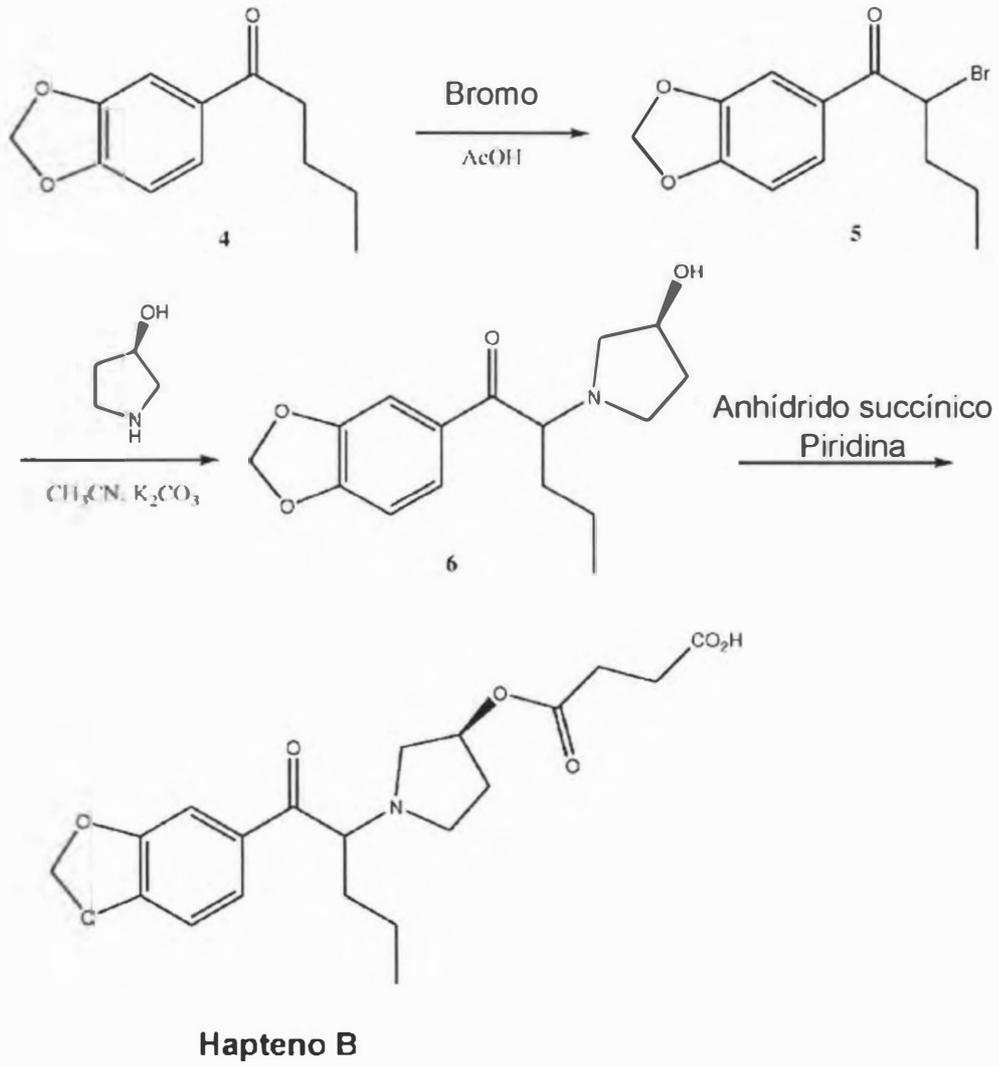


Figura 3

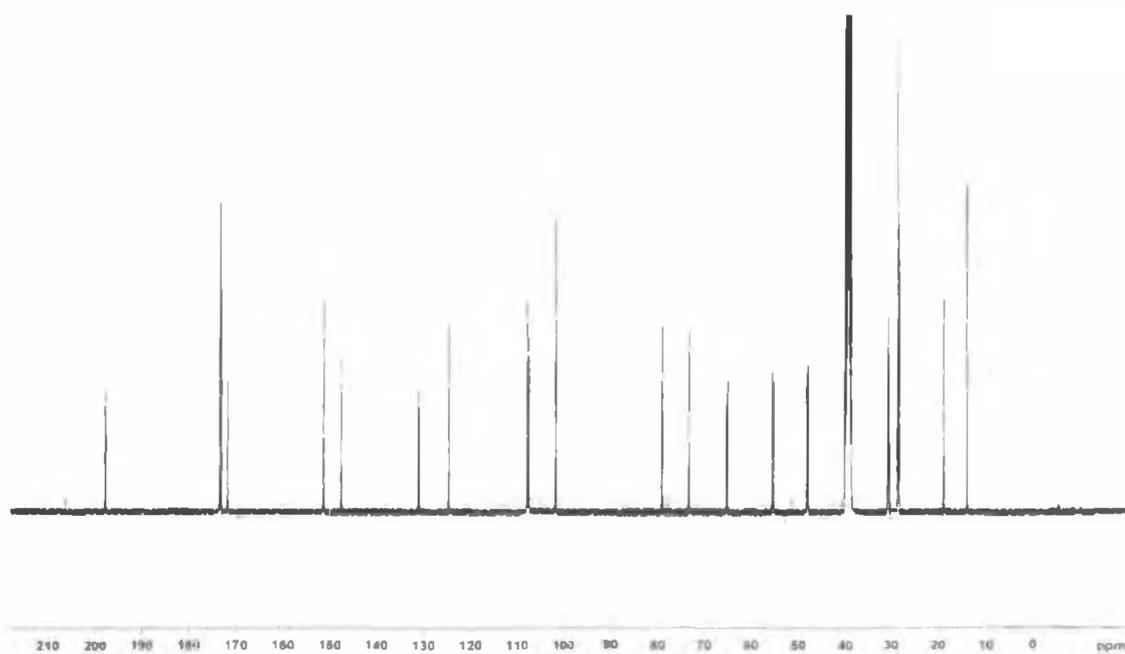


Figura 4

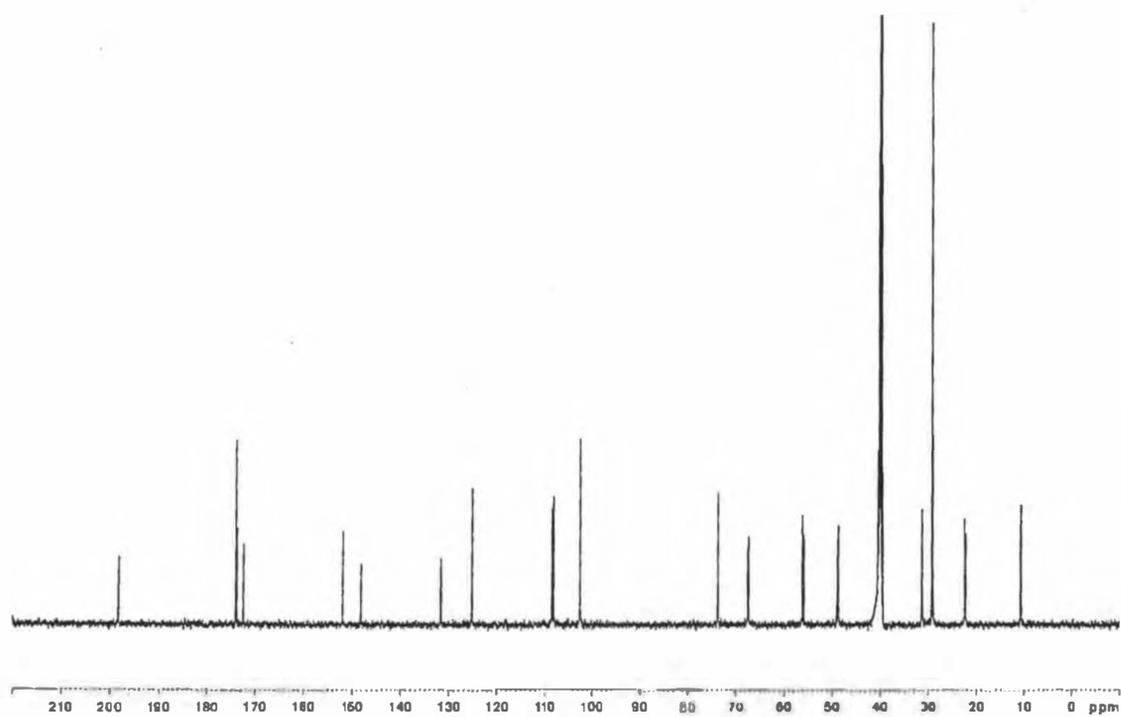


Figura 5

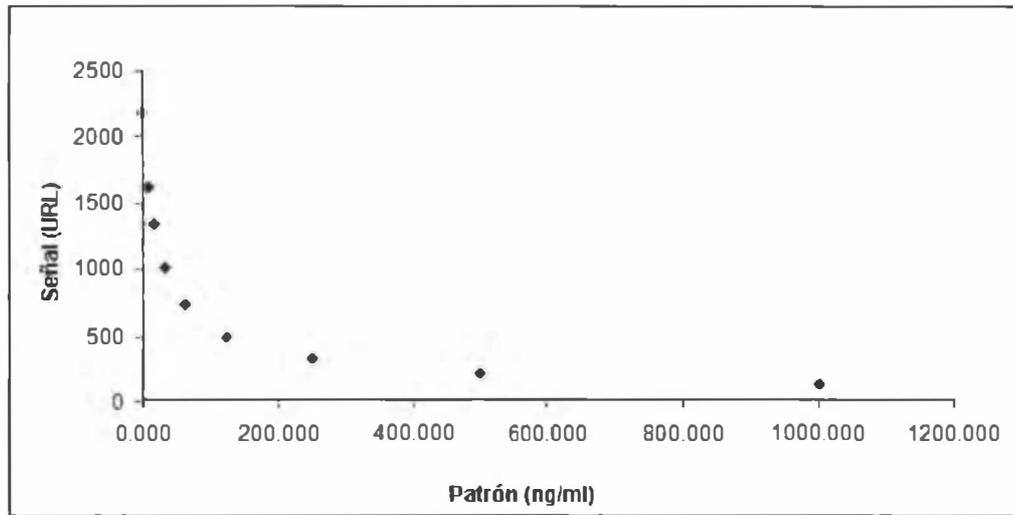


Figura 6