

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 680**

51 Int. Cl.:

C07D 295/096 (2006.01)

C07D 295/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013** **E 13156414 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2631231**

54 Título: **Ensayo para la detección de la familia de fenilpiperazina**

30 Prioridad:

24.02.2012 GB 201203266

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

14.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 680 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

Ensayo para la detección de la familia de fenilpiperazina

Antecedentes

5 En los últimos años, los derivados de piperazina han surgido como una nueva clase de drogas de diseño, obteniendo popularidad especialmente entre la gente joven en el ambiente de la música dance en donde se conocen comúnmente como “pastillas de fiesta”. Se comercializan a menudo como productos “naturales” o “fitoterápicos”, pero de hecho son productos químicos completamente sintéticos. Junto con su fácil disponibilidad y estado legal variable en todo el mundo, esto puede crear la concepción errónea de que estas drogas son seguras y no tienen los riesgos comúnmente asociados con las drogas callejeras tradicionales. Se encuentran habitualmente derivados de piperazina en formas de dosificación ilícitas como comprimidos o cápsulas, aunque también pueden producirse polvos sueltos y más raramente disoluciones. Los comprimidos a menudo portan logotipos similares a los observados en comprimidos de éxtasis y a menudo se venden engañosamente como éxtasis o como alternativas aparentemente “más seguras” y “legales”. Su nombre se deriva del heterociclo de piperazina que es una característica común y pueden dividirse en dos subclases; las bencilpiperazinas, tales como la propia 1-bencilpiperazina (BZP), y las fenilpiperazinas que incluyen 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP) y 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP) (la figura 1 muestra la estructura de estos y otros derivados de fenilpiperazina).

20 Las fenilpiperazinas se metabolizan de manera extensa siendo la reacción metabólica principal la alteración del anillo aromático, o bien mediante hidroxilación (mCPP, TFMPP) o bien mediante O-desmetilación del resto metoxilo (MeOPP) (Maurer *et al.*, 2004). También se observa la degradación metabólica del resto piperazina para dar los correspondientes derivados de etilendiamina o anilina. Las reacciones metabólicas de fase II son glucuronidación o sulfatación parcial de los metabolitos fenólicos, metilación de los catecoles y acetilación parcial de los derivados de anilina (Maurer *et al.*, 2004).

25 Una de las fenilpiperazinas más extendidas, mCPP, es un metabolito activo del fármaco antidepresivo trazodona y fármacos terapéuticos relacionados. mCPP es un agonista del receptor de 5-HT con propiedades estimulantes y alucinógenas similares a 3,4-metilendioxi-N-metanfetamina (MDMA; el principio activo del éxtasis), a diferencia de MDMA no provoca un aumento en la frecuencia cardiaca o la tensión arterial. Hay dos isómeros de posición de mCPP, 1-(4-clorofenil)piperazina y 1-(2-clorofenil)piperazina. En 2006, se estimó que casi el 10 % de los comprimidos ilícitos vendidos en la UE, como parte del mercado ilícito del éxtasis, contenían mCPP (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA). Se ha sugerido ahora a partir de informes anecdóticos de usuarios en línea que al menos el 50 % de las pastillas de éxtasis vendidas en el Reino Unido y el resto de Europa pueden contener mCPP como principio activo primario (EMCDDA). Tras la administración oral de mCPP a voluntarios masculinos sanos, la semivida de eliminación oscila entre 2,6 y 6,1 horas con una amplia variación en los niveles en sangre máximos y la biodisponibilidad (EMCDDA). Los efectos negativos de mCPP, a menudo típicos de un síndrome de serotonina, incluyen ansiedad, mareo, confusión, escalofríos, sensibilidad a la luz y el ruido, miedo a perder el control, migraña y crisis de angustia (EMCDDA).

40 Otro derivado de piperazina encontrado comúnmente en pastillas de fiesta es TFMPP. TFMPP actúa como agonista del receptor de serotonina no selectivo, además de estimular los niveles de serotonina sinápticos bloqueando la recaptación de serotonina y aumentando su liberación (Nikolova & Danchev, 2008). No tiene uso terapéutico, pero se ha vendido como droga recreativa usada como alternativa “legal” a drogas ilícitas tales como dietilamida de ácido lisérgico (LSD) y MDMA. TFMPP tiene propiedades similares a los efectos estimulantes del éxtasis, pero tomada en dosis más grandes promueve reacciones alucinógenas (Nikolova & Danchev, 2008). Se encuentra casi siempre en combinación con BZP, con la que tiene una relación sinérgica. La combinación de BZP/TFMPP conduce a aumentos en los niveles de dopamina y serotonina mayores que los observados cuando se toma cualquiera individualmente (Baumann *et al.*, 2005). Esto permite a los fabricantes disminuir la dosis de cada uno sin poner en peligro el efecto de las drogas. Se ha mostrado que TFMPP se metaboliza de manera extensa (Staack *et al.*, 2003), principalmente mediante hidroxilación del anillo aromático y mediante degradación del resto piperazina para dar N-(3-trifluorometilfenil)etilendiamina, N-(hidroxiltrifluorometilfenil)etilendiamina, 3-trifluorometilanilina e hidroxil-3-trifluorometilanilina, mientras que las reacciones de fase II incluían glucuronidación, sulfatación y acetilación de metabolitos de fase I.

55 MeOPP (sinónimos: 1-(4-metoxifenil)piperazina, Paraperazina, 4-MeOPP) es otro derivado de piperazina que se ha vendido como componente en “pastillas de fiesta”, inicialmente en Nueva Zelanda y posteriormente en otros países de todo el mundo (Maurer *et al.*, 2004). Tiene efectos similares a los del éxtasis aunque mucho menos potentes (Nikolova & Danchev, 2008). Como TFMPP, se encuentra comúnmente en combinación con BZP potenciando sus efectos. De hecho se han observado diversas mezclas de derivados de piperazina consistiendo la mayoría en variaciones de BZP, TFMPP, mCPP y dibencilpiperazina (DBZP), algunas veces mezcladas con otras sustancias tales como anfetamina, cocaína, ketamina, MDMA y cafeína (EMCDDA; Drug Enforcement Administration [DEA], informe de 2009). Con la creciente criminalización de derivados de fenilpiperazina tales como los comentados anteriormente, existe la necesidad de una técnica sencilla y rápida que permita realizar pruebas sistemáticas de estas drogas.

Los métodos analíticos que se han usado para detectar o determinar derivados de piperazina incluyen CG-EM y CL-EM (Staack & Maurer 2003; Antia *et al.*, 2010). Peters *et al.*, (2010) presentan una revisión de la toxicología analítica de las drogas emergentes, entre ellas las piperazinas. Una desventaja de los métodos basados en espectrometría de masas es que requieren un equipo caro y un personal muy bien formado. Se conocen en la técnica inmunoensayos como alternativas relativamente económicas, simples y rápidas al análisis basado en espectrometría de masas. Se ha mostrado que una prueba de inmunoensayo enzimático disponible comercialmente, el ensayo de éxtasis EMIT II plus (SYVA/Dade Behring), tiene reactividad cruzada con TFMPP y mCPP a concentraciones de 5.000-10.000 ng/ml (Logan *et al.*, 2010). Los fabricantes no incluyen información sobre la reactividad cruzada con mCPP o TFMPP en el encarte del kit y los niveles de detección de este kit son insuficientes para los fines de las pruebas. La publicación de la patente internacional n.º WO2010142974 describe anticuerpos y métodos para diferenciar entre mCPP metabólica como resultado de que un individuo tome fármacos antidepresivos y mCPP que se toma de manera ilícita. Sin embargo, estos anticuerpos no reaccionan de manera cruzada con otros derivados de fenilpiperazina. Por tanto, sigue sin haber una prueba de detección fácilmente disponible específica para derivados de fenilpiperazina y por tanto para solucionar este problema se requiere un método rápido y económico para detectar y determinar la gama de derivados de fenilpiperazina encontrados en drogas de diseño.

El documento EP2261259 describe un anticuerpo, generado a partir del inmunógeno I, que se une a un epítipo de una N-(3-clorofenil)piperazina N'-sustituida o no sustituida, para su uso en la detección o determinación de N-(3-clorofenil)piperazina y N-(3-clorofenil)piperazinas N'-sustituidas en una disolución o una muestra *in vitro* tomada de un paciente.

20 Bibliografía

- Antia, U., Tingle, M.D., Russell, B.R. (2010) *J Forensic Sci*, 55(5):1311-8.
- Baumann, M. *et al.* (2005) *Neuropsychopharmacology*, 30: 550-560.
- DEA report - <http://www.justice.gov/dea/programs/forensicsci/microgram/mg0509/mg0509.pdf>.
- EMCDDA -<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/bzp>.
- 25 Fitzgerald S.P. *et al.* (2005). *Clin. Chem.*, 51: 1165-1176.
- Logan, B.K. *et al.* (2010) *J Anal Toxicol*, 34:587-589.
- Maurer, H.H. *et al.* (2004) *Ther Drug Monit*, 26(2): 127-131.
- Nikolova, I. & Danchev, N. (2008) *Biotechnol & Biotechnol Eq*, 22: 652-655.
- Peters, F.T. *et al.* (2010) *Ther Drug Monit*, 32(5): 532-539.
- 30 Staack, R.F. & Maurer, H.H. (2003) *J Anal Toxicol*, 27(8):560-568.
- Staack, R.F. *et al.* (2003) *J Mass Spectrom*, 38(9): 971-981.
- Documento WO2010142974 - Benchikh, E. *et al.*

Sumario de invención

35 La presente invención describe inmunógenos novedosos que se usan en la producción de anticuerpos novedosos con propiedades de unión únicas porque reaccionan de manera cruzada con diversos derivados de fenilpiperazina. Estos anticuerpos permiten métodos y kits para detectar y/o determinar derivados de fenilpiperazina (por ejemplo mCPP, TFMPP y MeOPP) en una muestra *in vitro* que son ventajosos con respecto a los métodos analíticos disponibles actualmente en cuanto a coste, facilidad de uso, velocidad y sensibilidad.

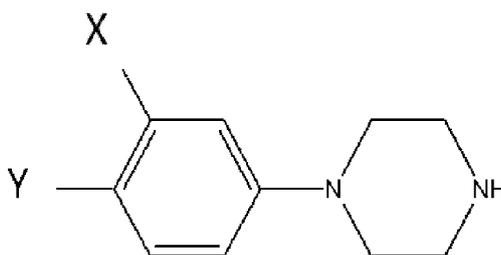
Descripción de los dibujos

- 40 Figura 1 Estructuras de derivados de fenilpiperazina
- Figura 2 Estructuras de los haptenos A y B
- Figura 3 Preparación del hapteno B

Descripción detallada

45 A menos que se establezca otra cosa, los términos técnicos del presente documento se utilizan según el uso convencional conocido por los expertos en la técnica.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un hapteno de estructura general:



- 5 en la que uno de X e Y es H y el otro es $-(A)_m-B-D$, estando A unido al anillo aromático, y en el que; A es $-C(O)-$, O ó NH y $m=0$ ó 1; B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_{10} , preferiblemente C_1-C_6 , o resto arileno, y D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimida, un resto hidroxilo, un resto tiol o un resto aldehído.
- Opcionalmente, A se une al anillo aromático. Además opcionalmente, A se une a la posición 3 del anillo aromático. Todavía además opcionalmente, A se une a la posición meta del anillo aromático. Alternativamente, A se une a la posición 4 del anillo aromático. Todavía además opcionalmente, A se une a la posición para del anillo aromático.
- Opcionalmente, A se selecciona de $-C(O)-$, O y NH.
- 10 Opcionalmente, $m = 0$ ó 1.
- Opcionalmente, B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_{10} , preferiblemente C_1-C_6 . Además opcionalmente, B es un resto arileno de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_{10} , preferiblemente C_1-C_6 .
- 15 Opcionalmente, D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimidilo, un resto hidroxilo, un resto tiol y un resto aldehído.
- Opcionalmente, X es H e Y es $-(A)_m-B-D$, en el que A se une a la posición 4 del anillo aromático; en el que A se selecciona de $-C(O)-$, O y NH; en el que $m = 0$ ó 1; en el que B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_{10} , preferiblemente C_1-C_6 o resto arileno; y en el que D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimidilo, un resto hidroxilo, un resto tiol y un resto aldehído.
- 20 Opcionalmente, Y es H y X es $-(A)_m-B-D$, en el que A se une a la posición 3 del anillo aromático; en el que A se selecciona de $-C(O)-$, O y NH; en el que $m = 0$ ó 1; en el que B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_{10} , preferiblemente C_1-C_6 o resto arileno; y en el que D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimidilo, un resto hidroxilo, un resto tiol y un resto aldehído.
- 25 Opcionalmente, uno de X e Y es H y el otro es $-(A)_m-(B)_n-D$; en el que A se une al anillo aromático; en el que A se selecciona de $-C(O)-$, O y NH; en el que $m = 0$ ó 1; en el que B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_{10} , preferiblemente C_1-C_6 o resto arileno; en el que $n = 0$ ó 1; y en el que D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimidilo, un resto hidroxilo, un resto tiol y un resto aldehído.
- 30 Opcionalmente, Y es H; X es $-(A)_m-(B)_n-D$; en el que $m = 0$; en el que $n = 0$; y en el que D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimidilo, un resto hidroxilo, un resto tiol y un resto aldehído. Además opcionalmente, Y es H; X es $-(A)_m-(B)_n-D$; en el que $m = 0$; en el que $n = 0$; y en el que D es un resto carboxilo.
- 35 Opcionalmente, X es H; Y es $-(A)_m-(B)_n-D$; en el que A se une a la posición 4 del anillo aromático; en el que A es O; en el que $m = 1$; en el que B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_6 ; en el que $n = 1$; y en el que D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimidilo, un resto hidroxilo, un resto tiol y un resto aldehído. Además opcionalmente, X es H; Y es $-(A)_m-(B)_n-D$; en el que A se une a la posición 4 del anillo aromático; en el que A es O; en el que $m = 1$; en el que B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada no sustituido C_1 ; en el que $n = 1$; y en el que D es un resto carboxilo.
- El término "hapteno" tal como se usa en el presente documento describe una molécula preinmunógena que estimula la producción de anticuerpos sólo cuando se conjuga con una molécula portadora más grande.
- 40 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un inmunógeno que comprende un hapteno tal como se describió anteriormente conjugado con un material portador que confiere antigenicidad (accm). El accm puede acoplarse al anillo aromático. Opcionalmente, el accm se acopla a la posición 3 del anillo aromático. Además opcionalmente, el accm se acopla a la posición meta del anillo aromático. Alternativamente, el accm se acopla a la posición 4 del anillo aromático. Todavía además opcionalmente, el accm se acopla a la posición para del anillo aromático.
- 45 En la realización preferida de la presente invención el accm se acopla a D, cuando X o Y es $-(A)_m-B-D$. Se entiende que el accm forma un enlace, opcionalmente un enlace covalente, con D. El término "inmunógeno" tal como se usa en el presente documento describe una entidad que induce una respuesta inmunitaria tal como

producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal huésped. El accm puede ser cualquier material que haga que todo o parte del hapteno sea susceptible al reconocimiento y la unión por anticuerpos. Por ejemplo el accm puede ser una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores útiles que confieren antigenicidad son albúmina sérica bovina (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KLH), etc. Preferiblemente el accm es BTG.

Opcionalmente, el inmunógeno comprende:

(a) un hapteno que tiene la estructura general descrita anteriormente; en la que Y es H; X es $-(A)_m-(B)_n-D$; en el que $m = 0$; en el que $n = 0$; en el que D es un resto carboxilo; y

10 (b) un accm seleccionado de albúmina sérica bovina (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG) y hemocianina de lapa californiana (KLH).

Opcionalmente, el inmunógeno comprende:

(a) un hapteno que tiene la estructura general descrita anteriormente; en la que X es H; Y es $-(A)_m-(B)_n-D$; en el que A se une a la posición 4 del anillo aromático; en el que A es O; en el que $m = 1$; en el que B es un resto alquileo de cadena lineal no sustituido C_1 ; en el que $n = 1$; en el que D es un resto carboxilo; y

15 (b) un accm seleccionado de albúmina sérica bovina (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG) y hemocianina de lapa californiana (KLH).

Una realización preferida de la presente invención es un inmunógeno tal como se comentó anteriormente que es o bien 1-(3-carboxifenil)piperazina (hapteno - A, figura 2) o bien 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno - B, figura 2) acoplado a un material portador que confiere antigenicidad. Ejemplos de materiales portadores adecuados son BTG, BSA o KLH.

Los inmunógenos obtenidos en la presente invención se administran entonces a huéspedes mamíferos para provocar la producción de anticuerpos específicos, opcionalmente anticuerpos policlonales, que entonces se usan para desarrollar inmunoensayos para derivados de fenilpiperazina, empleando conjugados marcados como reactivos de detección.

Otro aspecto de la presente invención es un anticuerpo generado contra un inmunógeno tal como se describió anteriormente. Un anticuerpo preferido de la presente invención es un anticuerpo generado contra un inmunógeno tal como se describió anteriormente que comprende un hapteno en el que $Y=H$ y $X=-(A)_m-(B)_n-D$; estando A unido al anillo aromático, y en el que A es $-C(O)-$, O ó NH y $m=0$ ó 1; B es un resto alquileo de cadena lineal sustituido o no sustituido C_1-C_{10} , preferiblemente C_1-C_6 , o resto arileno; $n = 0$ ó 1; D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimida, un resto hidroxilo, un resto tiol o un resto aldehído, y el hapteno se conjuga con un material portador que confiere antigenicidad. Un anticuerpo incluso más preferido de la presente invención es un anticuerpo generado contra 1-(3-carboxifenil)piperazina (hapteno A, figura 2) acoplado con un material portador que confiere antigenicidad y que tiene especificidad para 1-(3-metilfenil)piperazina con un valor de CI_{50} de menos de 50 ng/ml, preferiblemente menos de 10 ng/ml, lo más preferiblemente alrededor de 1 ng/ml, que se caracteriza además opcionalmente por tener reactividad cruzada con al menos uno de 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-fenilpiperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(4-hidroxifenil) piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina, 1-(3-hidroxifenil)piperazina y 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina.

Un anticuerpo preferido adicional de la presente invención es un anticuerpo generado contra un inmunógeno tal como se describió anteriormente que comprende un hapteno en el que $X=H$ e $Y=-(A)_m-B-D$, estando A acoplado al anillo aromático y en el que A es $-C(O)-$, O ó NH y $m=0$ ó 1; B es un resto alquileo de cadena lineal sustituido o no sustituido C_1-C_{10} , preferiblemente C_1-C_6 , o resto arileno; D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimida, un resto hidroxilo, un resto tiol o un resto aldehído, y el hapteno se conjuga con un material portador que confiere antigenicidad. Un anticuerpo incluso más preferido es el generado contra un inmunógeno que es 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno B, figura 2) acoplado con un material portador que confiere antigenicidad y que tiene especificidad para 1-(3-metilfenil)piperazina con un valor de CI_{50} de alrededor de menos de 50 ng/ml, preferiblemente menos de 10 ng/ml, lo más preferiblemente alrededor de 1 ng/ml, que se caracteriza además opcionalmente por tener reactividad cruzada con al menos uno de 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-fenilpiperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina, 1-(3-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina.

El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una inmunoglobulina o molécula similar a inmunoglobulina. En una realización preferida de la presente invención los anticuerpos son anticuerpos monoclonales pero el experto entenderá que puede usarse cualquier tipo de molécula de inmunoglobulina o fragmento de la misma, por ejemplo anticuerpos policlonales, fragmentos Fab, fragmentos scFv y cualquier otro fragmento de unión a antígeno todos los cuales se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica (tal como se describe en "Monoclonal antibody production techniques and application" de L.B Schook, 1987, Dekker, ISBN

0824776402). Puede usarse cualquier animal huésped adecuado, preferiblemente un animal mamífero, por ejemplo, pero sin limitarse a una oveja, un conejo, un ratón, una cobaya o un caballo.

5 Cuando se usa en relación con un anticuerpo, la palabra “específico” o “especificidad” en el contexto de la presente invención se refiere al analito al que se une preferiblemente el anticuerpo, tal como se evalúa mediante una medición adecuada tal como la reactividad cruzada. Tal como conoce un experto en la técnica, para que la reactividad cruzada sea de uso práctico, el anticuerpo específico de analito debe presentar una alta sensibilidad tal como se mide mediante una medición adecuada tal como la CI_{50} . La CI_{50} es una medida común de la sensibilidad del anticuerpo para inmunoensayos. Para la presente invención, una alta sensibilidad es una CI_{50} de menos de 50 ng/ml, preferiblemente menos de 10 ng/ml, lo más preferiblemente alrededor de 1 ng/ml. En la presente invención una CI_{50} de “alrededor de 1 ng/ml” se refiere a anticuerpos con valores de CI_{50} de desde aproximadamente 0,5 ng/ml hasta aproximadamente 1,5 ng/ml. Los expertos en la técnica reconocen que para inmunoensayos que utilizan un formato de competencia, el valor de CI_{50} exacto varía ligeramente según la naturaleza del agente de detección usado para competir con el analito en la muestra.

15 Los anticuerpos de la invención pueden usarse aislados o en combinaciones en un método para detectar o determinar uno o más derivados de fenilpiperazina en una muestra (se presentan ejemplos en la figura 1). Lo más preferiblemente los anticuerpos de la invención se usan en un método para detectar o determinar uno o más de 1-fenilpiperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(3-metilfenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 1-(4-clorofenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con el anticuerpo o combinación de los anticuerpos y opcionalmente uno o más agentes de detección, deducir la presencia de o la cantidad de uno o más de 1-fenilpiperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(3-metilfenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 1-(4-clorofenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina; opcionalmente midiendo el/los agente(s) de detección y deduciendo a partir de un calibrador la presencia de o la cantidad de uno o más de 1-fenilpiperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(3-metilfenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 1-(4-clorofenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina. En una realización preferida la combinación es un anticuerpo generado contra un inmunógeno que consiste en 1-(3-carboxifenil)piperazina (hapteno A, figura 2) acoplado con un material portador que confiere antigenicidad y un anticuerpo generado contra un inmunógeno que consiste en 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno B, figura 2) acoplado con un material portador que confiere antigenicidad. El acm preferido es BTG. Inesperadamente esta combinación de dos anticuerpos derivados de inmunógenos conjugados a través de dos posiciones adyacentes en los haptenos y un único conjugado o agente de detección marcado, produjo un ensayo sensible capaz de detectar o determinar una amplia gama de derivados de piperazina (tabla 1).

35 Otra realización preferida de la invención es un método para detectar o determinar uno o más derivados de fenilpiperazina en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un anticuerpo generado contra un inmunógeno que consiste en 1-(3-carboxifenil)piperazina (hapteno A, figura 2) acoplado con un material portador que confiere antigenicidad y opcionalmente uno o más agentes de detección que deducen la presencia de o la cantidad de uno o más derivados de fenilpiperazina, opcionalmente midiendo el/los agente(s) de detección y deduciendo a partir de un calibrador la presencia de o la cantidad de uno o más derivados de fenilpiperazina.

40 Una realización adicional de la invención es un método para detectar o determinar uno o más derivados de fenilpiperazina en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un anticuerpo generado contra un inmunógeno que consiste en 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno B, figura 2) acoplado con un material portador que confiere antigenicidad y uno o más agentes de detección, medir el/los agente(s) de detección y deducir a partir de un calibrador la presencia de o la cantidad de uno o más derivados de fenilpiperazina.

50 Los términos “detectar” o “detección” tal como se usan en el presente documento se refieren a analizar cualitativamente la presencia o ausencia de una sustancia, mientras que “determinar” se refiere a analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia presente. Puesto que los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a varias moléculas, el análisis cuantitativo adoptará la forma de medir el valor equivalente de calibrador. El experto en la técnica también reconocerá que para los fines de un ensayo positivo, podría implementarse un valor de punto de corte adecuado. La muestra en la presente invención puede ser cualquier muestra biológica a partir de la cual pueda detectarse un derivado de fenilpiperazina. Preferiblemente la muestra se toma del grupo de sangre completa, plasma, suero y orina, sin embargo puede usarse cualquier muestra biológica a partir de la cual podría detectarse una fenilpiperazina, por ejemplo cabello o saliva.

55 Los agentes de detección de la presente invención comprenden un hapteno, preferiblemente uno tal como se describe en el presente documento, conjugado con un agente de marcaje detectable. 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 y lo más preferiblemente peroxidasa del rábano. Lo más preferiblemente el agente de detección es 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina unida covalentemente a un agente de marcaje detectable. Un ejemplo de un agente de marcaje adecuado es peroxidasa del rábano.

La invención también describe kits para detectar o determinar uno o más derivados de fenilpiperazina. Preferiblemente el kit es uno en el que el uno o más derivados de piperazina detectados o determinados son 1-fenilpiperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(3-metilfenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 1-(4-clorofenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina. En una realización preferida de la presente invención el kit comprende uno o más de los anticuerpos derivados de los inmunógenos descritos anteriormente y al menos un agente de detección.

En una realización adicional preferida el kit comprende un anticuerpo derivado de hapteno A (figura 2) y un anticuerpo derivado de hapteno B (figura 2) junto con al menos un agente de detección, y el uno o más derivados de piperazina detectados o determinados son 1-fenilpiperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(3-metilfenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 1-(4-clorofenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina. Los anticuerpos de los kits preferiblemente están anclados a un soporte sólido adecuado tal como un chip. Aunque el soporte sólido puede ser de cualquier conformación 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 y opcionalmente incluye instrucciones para el uso de los anticuerpos del kit y, si se incorporan, los calibradores y agentes de detección, para detectar y determinar derivados de fenilpiperazina.

Métodos generales, ejemplos y resultados

Desarrollo del inmunoensayo

El proceso de desarrollo de un inmunoensayo lo conoce bien el experto en la técnica (tal como se describe en "Immunoassay: A practical guide" de Brian Law, Taylor & Francis Ltd, ISBN 0-203-48349-9). En resumen, para un inmunoensayo competitivo en el que el analito diana es una molécula no inmunógena tal como un hapteno, se realiza el siguiente procedimiento: se producen anticuerpos inmunizando un animal, preferiblemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno. Se recoge el suero del animal inmunizado cuando el título de anticuerpo es suficientemente alto. Se añade un agente de detección a una muestra que contiene el analito diana y los anticuerpos generados, 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.

Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

Aunque los haptenos proporcionan epítopos estructurales definidos, no son por sí mismos inmunógenos y por tanto es necesario conjugarlos con materiales portadores, que provocarán una respuesta inmunógena cuando se administran a un animal huésped. 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, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KLH), etc. Alternativamente, pueden emplearse poli(aminoácidos) sintéticos que tengan un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina [¿ejemplos de poli(aminoácidos) sintéticos?], como también cualquier otro material polimérico natural o sintético que lleve grupos funcionales reactivos [¿ejemplos de materiales poliméricos naturales o sintéticos?]. También pueden conjugarse hidratos de carbono, levaduras o polisacáridos con el hapteno para producir un inmunógeno. Los haptenos también pueden acoplarse a 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 (conjugados) 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 tal como se describe en "Bioconjugation Techniques" de Greg T. Hennanson, Academic Press, páginas 419-455 y "Bioconjugation" de Mohammed Aslam y Alastair Dent, ISBN 1-56159-161-0 (1998) páginas 364-482. Con el fin de confirmar que se ha logrado una conjugación adecuada del hapteno con el material portador, antes de la inmunización, se evalúa cada inmunógeno usando espectroscopía de masas de desorción/ionización por láser UV asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). En el caso de los materiales portadores preferidos, BSA, BTG y KLH, se prefiere un mínimo de seis moléculas de hapteno por molécula de material portador.

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

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

Preparación de antisueros

Con el fin de generar antisueros policlonales, se preparan 2 mg de un inmunógeno de la presente invención en PBS, mezclado a una razón del 50 % de inmunógeno en PBS con el 50 % de adyuvante completo de Freund (Sigma, número de producto -F5881) y se emulsiona haciendo pasar repetidamente la mezcla a través de una punta en el extremo de una jeringa de 1 ml, hasta que alcanza la consistencia semisólida requerida. Entonces se inyecta 1 ml de la mezcla en un animal huésped, tal como conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. Las ovejas son el animal huésped preferido. Se administran inyecciones adicionales (refuerzos) mensualmente (se prepara 1 mg de inmunógeno en PBS y se mezcla a una razón del 50 % de inmunógeno en PBS con el 50 % de adyuvante incompleto de Freund, número de producto de Sigma -F5506) hasta que se logra el título requerido. Se toman muestras de suero para la evaluación del título de anticuerpo.

En resumen, se recoge sangre aplicando presión a la vena yugular expuesta e insertando una aguja hipodérmica limpia de calibre 14 para extraer 500 ml de sangre por oveja, con gravedad. Se almacena la sangre a 37 °C durante un mínimo de una hora antes de separar los coágulos de los laterales de los frascos de centrifuga usando pipetas desechables de 1 ml (oscilación). Se almacenan las muestras a 4 °C durante una noche.

Después se centrifugan las muestras a 4200 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se vierte el suero y se centrifuga de nuevo, a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, antes de tomar alícuotas y almacenar a <-20 °C.

Se extrae la fracción de inmunoglobulina (Ig) de los antisueros por medio de precipitación con ácido caprílico/sulfato de amonio de la inmunoglobulina.

Se evalúa el título de anticuerpo recubriendo una placa de microtitulación (Thermo Fisher Scientific NUNC, 468667) con anticuerpo (125 µl/pocillo) en tampón de recubrimiento (Tris 10 mM pH 8,5) a 37 °C durante 2 horas. Entonces se lava la placa cuatro veces a lo largo de 10 minutos con TBST a concentración de trabajo. Se añaden 50 µl de muestra/patrón (1-fenilpiperazina) a los pocillos apropiados por triplicado, seguido por 75 µl de conjugado de hapteno-HRP y se incuba a 25 °C durante una hora. Entonces se lava la placa y se añaden 125 µl de TMB (Randox, 4380-15) a cada pocillo y se deja a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. Se detiene la reacción usando 125 µl de ácido sulfúrico 0,2 M. Se leen las absorbancias a 450 nm con un lector de microplacas de ELISA (BIO-TEK Instruments, Elx800) y se calculan las medias. Entonces puede determinarse la sensibilidad del anticuerpo.

Cuando se ha logrado el título óptimo, se extrae sangre del animal huésped para producir un volumen adecuado de antisuero específico (globalmente esto da como resultado 20 extracciones de sangre en total, lográndose aproximadamente 200 ml de antisuero por extracción de sangre). El grado de purificación de anticuerpo requerido depende de la aplicación prevista. Para muchos fines, no hay ningún requisito para la purificación, sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo va a inmovilizarse sobre un soporte sólido, pueden adoptarse etapas de purificación para retirar material no deseado y eliminar la unión no específica.

Si se requiere están disponibles diversas etapas de purificación, entre ellas la precipitación de inmunoglobulina (tal como se describió anteriormente), la purificación por afinidad específica de antígeno, la cromatografía de exclusión molecular y la cromatografía de intercambio iónico.

Ejemplos

(Los números en negrita se refieren a estructuras en la figura 3)

Ejemplo 1: Conjugación de 3-(carboxifenil)piperazina (hapteno-A) con BSA (para formar el inmunógeno-I)

A una disolución de 3-(carboxifenil)piperazina (hapteno-A) (30,9 mg, 0,15 mM) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (33,08 mg, 0,16 mM) y N-hidroxisuccinimida (18,7 mg, 0,16 mM) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una 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 una noche a 4° C. Después se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (tres cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se secó por congelación para dar el inmunógeno-I. Los resultados de MALDI mostraron que se habían conjugado 14,07 moléculas de hapteno-A con una molécula de BSA.

Ejemplo 2: Conjugación de 3-(carboxifenil)piperazina (hapteno-A) con BTG (para formar el inmunógeno-II)

A una disolución de 3-(carboxifenil)piperazina (hapteno-A) (41,8 mg, 0,203 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (46,01 mg, 0,223 mmol) y N-hidroxisuccinimida (25,66 mg, 0,223 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una 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 una noche a 4 °C. Después se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (tres cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se secó por congelación para dar el inmunógeno-II.

Ejemplo 3: Conjugación de 3-(carboxifenil)piperazina (hapteno-A) con HRP

Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una disolución de 3-(carboxifenil)piperazina (hapteno-A) (2 mg) en DMF (0,2 ml). Tras mezclar, se añadió gota a gota esta disolución 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 una noche. Se retiró el hapteno en exceso con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS a pH 7,2. Entonces se dializó el conjugado de hapteno-A-HRP durante una noche frente a 10 l de PBS a pH 7,2 a 4 °C.

Ejemplo 4: Preparación de 4-BOC-1-(4-hidroxifenil)piperazina 2

A una suspensión de 1-(4-hidroxifenil)piperazina 1 (8,91 g, 0,05 mol) en diclorometano (200 ml) se le añadió TEA (10,5 ml, 0,075 mol) y anhídrido BOC (9,8 g, 0,052 mol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una noche. Entonces se lavó la disolución con agua (1x100 ml), salmuera (1x100 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta sequedad. Se purificó el producto en bruto obtenido mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando acetato de etilo / hexano (50/50) para dar la 4-boc-1-(4-hidroxifenil)piperazina 2 (10,1 g, 77 %).

Ejemplo - 5: Preparación del éster 3

A una suspensión de hidruro de sodio (NaH) (1,53 g, 0,046 mol) en DMF (50 ml) bajo nitrógeno se le añadió gota a gota una disolución de N-boc-4-hidroxibencilpiperazina 3 (8,0 g, 0,038 mol) en DMF (50 ml) y se agitó la mezcla y se calentó a 60 °C durante una hora. Entonces se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y a la misma se le añadió gota a gota una disolución de bromoacetato de terc-butilo (11,1 g, 0,057) en DMF (25 ml) y se agitó la mezcla y se calentó a 60 °C durante cuatro horas. Después se enfrió la disolución hasta TA y se eliminó la DMF a vacío. Se añadió acetato de etilo (250 ml) al producto en bruto y entonces se lavó con agua (100 ml) y salmuera (100 ml). Entonces se secó la disolución sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta sequedad. Se purificó el producto en bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo / hexano (1/1) para dar el éster 3 (9,6 g, 67,1 %) en forma de aceite transparente.

Ejemplo - 6: Preparación de la sal de TFA de 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno-B)

A una disolución del éster 3 (3,5 g, 0,009 mol) en diclorometano (100 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (TFA) (30 ml) y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante una noche. Se concentró la disolución hasta sequedad y se trituró el producto en bruto obtenido con éter para dar un sólido blanco del hapteno-B como sal de TFA (2,3 g, 73 %) en forma de sal de TFA (figura 3).

Ejemplo 7: Conjugación de sal de TFA de 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno-B) con BSA (para formar el inmunógeno-III)

A una disolución de sal de TFA de 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno-B) (52,5 mg, 0,15 mM) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (33,08 mg, 0,16 mM) y N-hidroxisuccinimida (18,7 mg, 0,16 mM) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una 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 una noche a 4 °C. Después se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (tres cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se secó por congelación para dar el inmunógeno-III. Los resultados de MALDI mostraron que se habían conjugado 6,03 moléculas de hapteno-B con una molécula de BSA.

Ejemplo 8: Conjugación de sal de TFA de 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno-B) con BTG (para formar el inmunógeno-IV)

A una disolución de sal de TFA de 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno-B) (71,1 mg, 0,203 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (46,01 mg, 0,223 mmol) y N-hidroxisuccinimida (25,66 mg, 0,223 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una 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 una noche a 4 °C. Después se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (tres cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se secó por congelación para dar el inmunógeno-IV.

Ejemplo 9: Conjugación de sal de TFA de 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno-B) con HRP

Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una disolución de sal de TFA de 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina (hapteno-B) (2 mg) en DMF (0,2 ml). Tras mezclar, se añadió gota a gota esta disolución 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 una noche. Se retiró el hapteno en exceso con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS a pH 7,2. Entonces se dializó el conjugado de hapteno-HRP durante una noche frente a 10 l de PBS a pH 7,2 a 4 °C.

Ejemplo 10: Inmunoensayos para derivados de piperazina

Se usó un analizador Evidence Investigator semiautomatizado (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido) como plataforma para un ensayo de biochip para la detección de fenilpiperazinas. Se administraron inmunógenos a ovejas Suffolk de 16 meses de edad mensualmente para proporcionar antisueros policlonales específicos. Se preparó la mezcla de inmunización añadiendo 2 mg de inmunógeno preparado en PBS a una razón del 50 % de Inmunógeno/PBS con el 50 % de adyuvante completo de Freund (Sigma, número de producto - F5881) y emulsionando la mezcla para preparar el producto final para la inmunización. En el día 0, se administró por vía intramuscular 1 ml de la mezcla descrita anteriormente a ovejas adultas. Se administraron por vía intramuscular refuerzos posteriores (un total de 20 refuerzos) a cada oveja cada 30 días. Se usó adyuvante completo de Freund (Sigma, número de producto - F5881) para las inmunizaciones primarias y adyuvante incompleto de Freund (número de producto de Sigma - F5506) para todas las inyecciones posteriores. Se tomaron muestras de sangre sistemáticas entre los refuerzos para verificar el título de anticuerpo y la sensibilidad, usando hapteno B conjugado con peroxidasa del rábano en un ELISA de competencia, que somete a prueba la reactividad cruzada con 1-(3-clorofenil)piperazina. En el caso del inmunoensayo de combinación, se administraron los inmunógenos II y IV a ovejas separadas y se combinaron los antisueros resultantes en una razón 1:1 para formar la combinación de anticuerpos (se combinó 1 ml de antisueros de las ovejas a las que se les administró inmunógeno II con 1 ml de antisueros de las ovejas a las que se les administró inmunógeno IV). Se extrajo IgG de los antisueros y se purificó tal como se describió anteriormente, y se inmovilizaron los anticuerpos purificados sobre un biochip (9 mm x 9 mm) (Randox Laboratories Ltd). El ensayo se basaba en la competencia por los sitios de unión de un anticuerpo policlonal entre conjugado de hapteno B-HRP (ejemplo 9) y fenilpiperazinas y posibles compuestos con reacción cruzada. Se inmovilizaron los anticuerpos y se estabilizaron sobre la superficie del biochip tal como se describió anteriormente (Fitzgerald *et al.*, 2005). Se añadieron diluyente de ensayo (155 μ l), calibrador/fenilpiperazina o posible compuesto con reacción cruzada (25 μ l) seguido por conjugado de hapteno-B (120 μ l) al biochip apropiado. Entonces se incubaron los biochips durante 30 minutos a 30 °C en un agitador térmico fijado a 370 rpm. Después se sometieron los biochips a dos ciclos de lavado rápidos usando el tampón de lavado proporcionado, seguido por cuatro ciclos de lavado de dos minutos. Entonces se añadieron 250 μ l de señal (luminol + peróxido 1:1, v/v) a cada biochip, y tras dos minutos se obtuvieron imágenes del portador de biochip en el analizador Evidence Investigator.

Resultados

Se generaron curvas de calibración usando el inmunoensayo basado en biochip. Se calcularon valores de Cl_{50} a partir de las gráficas tomando el 50 % de la señal desde el calibrador cero y leyendo el valor correspondiente en el eje x, equivalente a la concentración de ligando no marcado que reduce en un 50 % la unión específica de ligando marcado. También se sometió a prueba la especificidad (medida como el porcentaje de reactividad cruzada - $[Cl_{50}(\text{analito})/Cl_{50}(\text{compuesto con reacción cruzada})] \times 100$) frente a una gama de derivados de piperazina y otros compuestos que comparten características estructurales (véase la tabla 1).

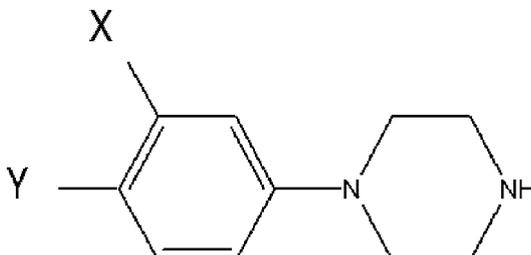
Tabla 1 Porcentaje de reactividad cruzada para dos anticuerpos de la presente invención (anticuerpo 1 generado contra el inmunógeno IV y anticuerpo 2 generado contra el inmunógeno II) normalizado con respecto a monoclorhidrato de 1-(3-clorofenil)piperazina.

Análito	Anticuerpo 1		Anticuerpo 2		Combinación de anticuerpos 1 y 2	
	Reactividad cruzada (%)	Cl ₅₀ (ng/ml)	Reactividad cruzada (%)	Cl ₅₀ (ng/ml)	Reactividad cruzada (%)	Cl ₅₀ (ng/ml)
1-(3-Clorofenil)piperazina (mCPP)	100	0,907	100	2,554	100	2,075
1-(3-Metilfenil)piperazina (mMPP)	129	0,840	230	1,697	191	1,418
1-fenilpiperazina	106	1,017	140	2,795	125	2,163
1-(4-Metoxifenil)piperazina (pMeOPP)	68	0,868	20	19,771	26	10,226
1-(4-hidroxifenil)piperazina	57	1,029	10	28,195	18	15,032
1-(4-Fluorofenil)piperazina	54	1,085	38	7,646	51	5,113
1-(3-hidroxifenil)piperazina	31	3,469	156	2,504	95	2,848
1-(3-Trifluorometilfenil)piperazina (mTFMPP)	13	7,620	61	4,831	44	5,958
4-(4-Clorofenil)-4-hidroxipiperidina	<1	218,980	<1	NA	<1	NA
1-bencilpiperazina (BZP)	<1	232,706	<1	NA	<1	NA
1-(2-Metoxifenil)piperazina	<1	335,160	34	8,770	17	15,553
Mefedrona	<1	NA	<1	NA	<1	NA
Mescalina	<1	NA	<1	NA	<1	NA
(+)-Pseudoefedrina	<1	NA	<1	NA	<1	NA
MDPBP	<1	NA	<1	NA	<1	NA
JWH-018	<1	NA	<1	NA	<1	NA
JWH-250	<1	NA	<1	NA	<1	NA
Salvinorina A	<1	NA	<1	NA	<1	NA
Piperazina	<1	NA	<1	NA	<1	NA
1-Metil-3-fenilpiperazina	<1	NA	<1	NA	<1	NA

Trazadona	<1	NA	<1	NA	<1	NA
MCPCP	<1	NA	<1	NA	<1	NA
3-Amino-2-hidroxibenzotrifluoruro	<1	NA	<1	NA	<1	NA

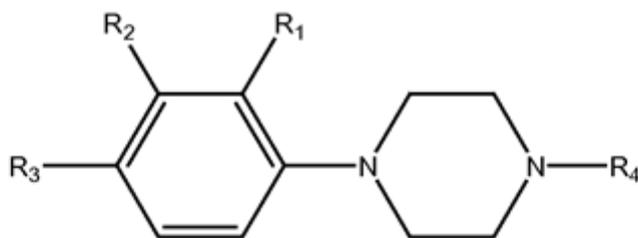
REIVINDICACIONES

1. Inmunógeno que comprende un hapteno de estructura general:



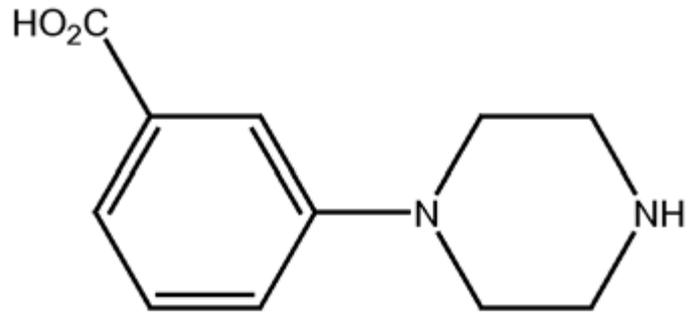
- 5 en la que uno de X e Y es H y el otro es $-(A)_m-(B)_n-D$; en el que A se une al anillo aromático; en el que A se selecciona de $-C(O)-$, O y NH; en el que $m = 0$ ó 1; en el que B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_{10} o resto arileno; en el que $n = 0$ ó 1; y en el que D se selecciona de un resto carboxilo, un resto ditiopiridilo, un resto maleimidilo, un resto hidroxilo, un resto tiol y un resto aldehído; estando acoplado dicho hapteno a un material portador que confiere antigenicidad seleccionado de un polipéptido sintético, un polipéptido semisintético, un fragmento de proteína o una proteína.
- 10 2. Inmunógeno según la reivindicación 1, en el que el material portador que confiere antigenicidad se selecciona de albúmina sérica bovina, tiroglobulina bovina, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina de huevo y gammaglobulina bovina.
3. Inmunógeno según la reivindicación 1, en el que B es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido C_1-C_6 o resto arileno.
- 15 4. Inmunógeno según la reivindicación 2, en el que D de $-(A)_m-B-D$ se acopla al material portador que confiere antigenicidad.
5. Inmunógeno según la reivindicación 4, que es o bien 1-(3-carboxifenil)piperazina o bien 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina acoplada al material portador que confiere antigenicidad.
6. Anticuerpo generado contra el inmunógeno según la reivindicación 5.
- 20 7. Anticuerpo según la reivindicación 6, generado contra el inmunógeno 1-(3-carboxifenil)piperazina según la reivindicación 5 que tiene especificidad para 1-(3-metilfenil)piperazina con un valor de CI_{50} de alrededor de 1 ng/ml, que se caracteriza adicionalmente por tener reactividad cruzada con 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-fenilpiperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina, 1-(3-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina.
- 25 8. Anticuerpo según la reivindicación 6, generado contra el inmunógeno 1-(4-carboximetileterfenil)piperazina según la reivindicación 5 que tiene especificidad para 1-(3-metilfenil)piperazina con un valor de CI_{50} de alrededor de 1 ng/ml, que se caracteriza adicionalmente por tener reactividad cruzada con 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-fenilpiperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina, 1-(3-hidroxifenil)piperazina y 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina.
- 30 9. Método de detección y/o determinación de uno o más derivados de piperazina en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con uno o más anticuerpos según la reivindicación 6, y al menos un agente de detección; detectar o determinar el/los agente(s) de detección y deducir a partir de una curva de calibración la presencia de y/o la cantidad de, el uno o más derivados de piperazina en la muestra.
- 35 10. Método según la reivindicación 9 para detectar y/o determinar uno o más derivados de piperazina en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con el anticuerpo según la reivindicación 7 y el anticuerpo según la reivindicación 8, y al menos un agente de detección; detectar o determinar el/los agente(s) de detección y deducir a partir de una curva de calibración la presencia de y/o la cantidad de, el uno o más derivados de piperazina en la muestra.
- 40 11. Método según la reivindicación 9 para detectar o determinar una o más de 1-fenilpiperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(3-metilfenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 1-(4-clorofenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina en una muestra *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo seleccionado del anticuerpo según la reivindicación 7, y el anticuerpo según la reivindicación 8 y al menos un agente de detección, detectar o determinar el/los agente(s) de detección y deducir a partir de una curva de calibración la presencia de o la cantidad de una o más de 1-fenilpiperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(3-metilfenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 1-(4-clorofenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina.

12. Método según la reivindicación 9, en el que la muestra se selecciona de sangre completa, plasma, suero y orina.
13. Kit para detectar o determinar uno o más derivados de piperazina en una muestra que comprende uno o más anticuerpos seleccionados del anticuerpo según la reivindicación 7, y el anticuerpo según la reivindicación 8; y al menos un agente de detección.
- 5
14. Kit según la reivindicación 13, en el que el uno o más derivados de piperazina detectados o determinados son 1-fenilpiperazina, 1-(4-hidroxifenil)piperazina, 1-(3-clorofenil)piperazina, 1-(4-metoxifenil)piperazina, 1-(3-metilfenil)piperazina, 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina, 1-(4-clorofenil)piperazina, 1-(4-fluorofenil)piperazina y 1-(2-metoxifenil)piperazina.
- 10
15. Kit según la reivindicación 14, que comprende el anticuerpo según la reivindicación 7 y el anticuerpo según la reivindicación 8.

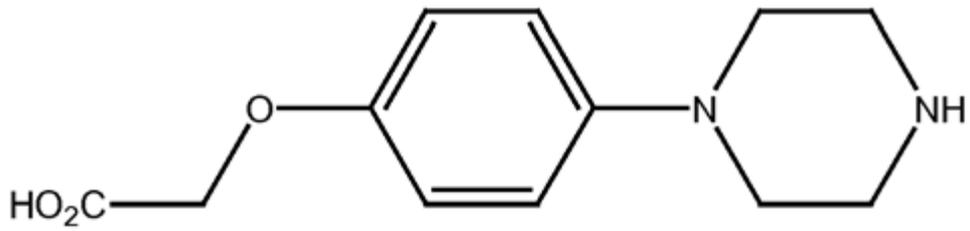


Nombre (acrónimo)	R1	R2	R3	R4
1-(3-Clorofenil)-4-(3-cloropropil)piperazina <i>(mCPCPP)</i>	H	Cl	H	-(CH ₂) ₃ -Cl
1-(3-Clorofenil)piperazina <i>(mCPP)</i>	H	Cl	H	H
1-(4-Clorofenil)piperazina <i>(pCPP)</i>	H	H	Cl	H
1-(4-Fluorofenil)piperazina <i>(pFPP)</i>	H	H	F	H
1-(2-Metoxifenil)piperazina <i>(oMeOPP)</i>	MeO	H	H	H
1-(4-Metoxifenil)piperazina <i>(pMeOPP)</i>	H	H	MeO	H
1-(3-Metoxifenil)piperazina <i>(mMPP)</i>	H	Metil	H	H
1-(4-Metilfenil)piperazina <i>(pMPP)</i>	H	H	Metil	H
1-(3-Trifluorometilfenil)piperazina <i>(mTFMPP)</i>	H	CF ₃	H	H

Figura 1



Hapteno - A



Hapteno - B

Figura 2

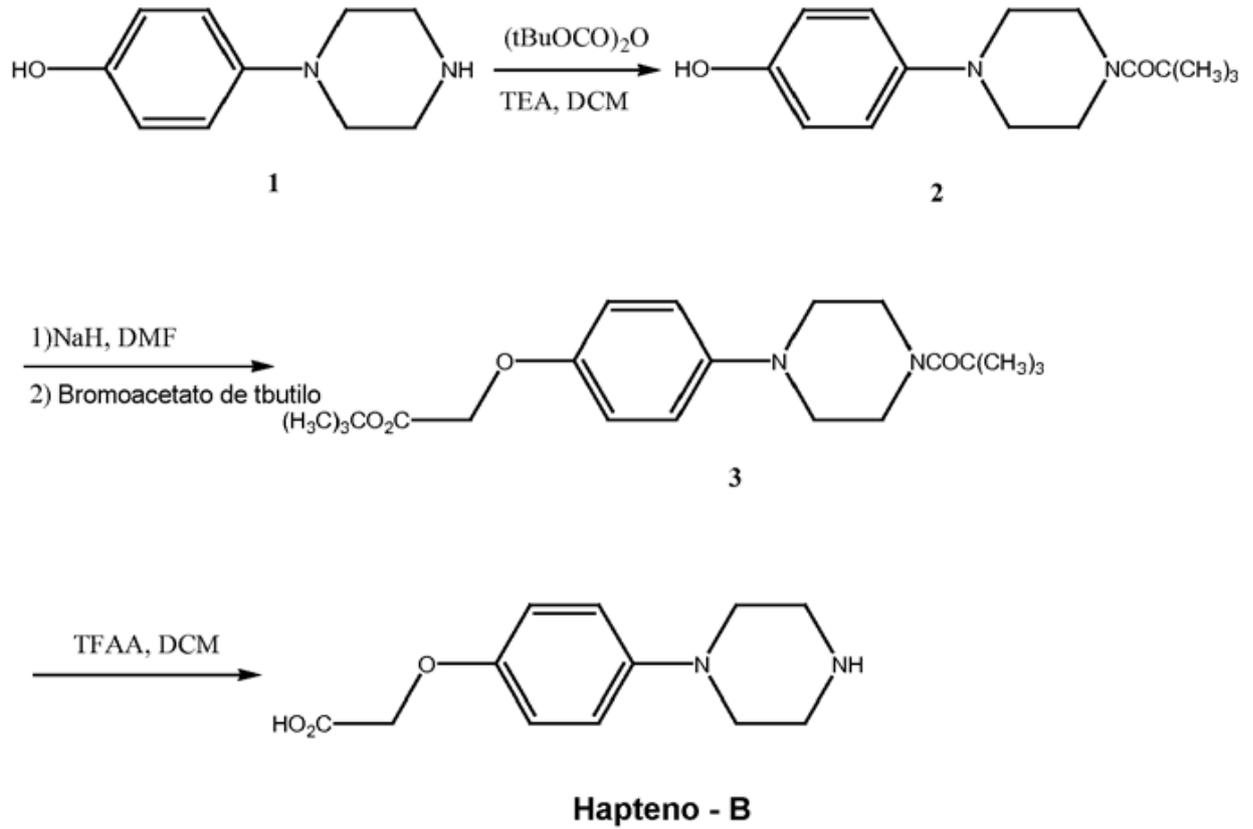


Figura 3