

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 733**

51 Int. Cl.:

C07K 16/16 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2014 E 14155565 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2769987**

54 Título: **Inmunoensayo de detección del kratom, sus componentes y uso**

30 Prioridad:

22.02.2013 GB 201303168

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

01.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 603 733 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo de detección del kratom, sus componentes y uso

La invención se refiere al campo del análisis de drogas y a la detección y cuantificación del constituyente principal de *Mitragyna speciosa*, comúnmente denominado como 'Kratom', la mitraginina (nombre sistemático éster metílico del ácido (E)-2-[(2S,3S,12bS)-3-etil-8-metoxi-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3-a]quinoxilizin-2-il]-3-metoxi propenoico) y su metabolito principal 8-desmetilmitraginina (nombre sistemático éster metílico del ácido (E)-2-[(2S,3S,12bS)-3-etil-8-hidroxi-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3-a]quinoxilizin-2-il]-3-metoxi propenoico, también denominado en la bibliografía como 5-desmetilmitraginina y 9-desmetilmitraginina). El reciente aumento de la psicoestimulación inducida por drogas recreativas y la simultánea diversidad y cantidad de sustancias ingeridas para conseguir este efecto, incluye el uso del Kratom. Se afirma que el Kratom tiene propiedades medicinales y, aunque es ilegal en determinados países, sigue siendo legal en los EE.UU., en el Reino Unido y en la mayor parte de Europa. Ha habido informes recientes de numerosas muertes asociadas con su ingestión y existe un creciente interés en la detección del Kratom, a través de la mitraginina y sus metabolitos, para fines toxicológicos y de investigación. Los procedimientos analíticos descritos para la detección y cuantificación de la mitraginina y sus metabolitos utilizan la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o la espectroscopia de masas unida a ya sea cromatografía de gases (CG-EM) o cromatografía líquida (CL-EM) (por ejemplo, Kaewklum 2005, Janchawee 2007, Le 2012, Lu 2009), técnicas relativamente caras, dependientes de un operario experto.

Adicionalmente, las técnicas pueden complicarse por la necesidad de un pretratamiento de la muestra antes del análisis. Por lo tanto, existe una densidad clínica y forense de detectar de forma rápida y económica, y de cuantificar la mitraginina y sus metabolitos en muestras de pacientes y en sustancias que se sospecha que incorporan kratom.

Referencias

Janchawee y col. 2007. A high-performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rates. *Biomedical Chromatography*, 21: 176-83.

Kaewklum S. y col. 2005. Detection of mitragynine and its metabolite in urine following ingestion of leaves of *Mitragyna speciosa* korth. En: *Recent advances in doping analysis* (13) pág. 403-406. W. Schanzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck (eds.), Sport und Buch Strauß, Köln.

Lu S y col. 2009. Quantitative analysis of mitragynine in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(24): 2499-2505.

Le D. y col. 2012. Analysis of mitragynine and metabolites in human urine for detecting the use of the psychoactive plant kratom. *Journal of Analytical Toxicology*, 36: 616-625.

Sumario de la invención

El inmunodiagnóstico es una tecnología analítica relativamente económica y que se implementa de forma fácil. La invención descrita en el presente documento, sustentada por un anticuerpo que se une a la mitraginina y 8-desmetilmitraginina, supera los problemas asociados con las actuales técnicas analíticas del kratom. Esta invención también describe procedimientos, un inmunoensayo y sustratos que incorporan el anticuerpo.

Figuras

Figura 1 - Alcaloides del Kratom y metabolitos identificados. La numeración destacada en la mitraginina se adopta en todo el documento.

Figura 2 - Alcaloides del Kratom.

Figura 3 - Glucurónidos y sulfatos de 8-desmetilmitraginina y 7 a-hidroximitraginina

Figura 4 - hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina (Hapteno-3, parte superior) y Hapteno-3 conjugado con HRP (parte inferior)

Figura 5 - Síntesis de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina (Hapteno 3)

Descripción detallada de la invención

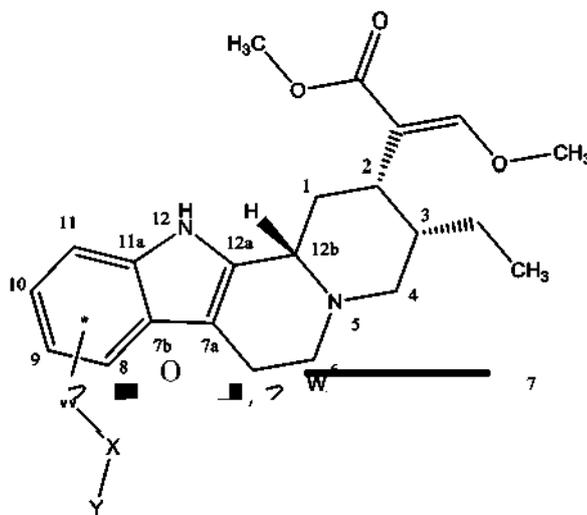
En un primer aspecto la invención describe anticuerpos que se unen de forma específica a un epítipo de la mitraginina y a sus metabolitos, en especial metabolitos de la mitraginina modificados de forma estructural en la posición 8 tal como 8-glucuronidildmitraginina y 8-sulfonildmitraginina. En una realización preferente los anticuerpos se unen a la mitraginina y al metabolito principal 8-desmetilmitraginina (Figura 1). Los metabolitos 8-desmetilmitraginina, 8-glucuronidildmitraginina y 8-sulfonildmitraginina corresponden a la mitraginina modificada de forma estructural en la posición 8. Por ejemplo, para el metabolito 8-desmetilmitraginina la modificación estructural de la mitraginina es el reemplazo de un grupo metilo por un átomo hidrógeno. La frase 'de forma específica' implica que los anticuerpos de la invención se unen de forma casi exclusiva a una estructura molecular contenida dentro de, y común a, las moléculas de mitraginina mencionadas anteriormente; esto puede verificarse calculando medidas adecuadas tales como la sensibilidad y la reactividad cruzada. Al analito con la mayor reactividad cruzada se le

proporciona un valor del 100 %, otorgándose a todos los otros analitos un valor relativo respecto a este.

5 Como reconoce un experto en la materia, hasta cierto punto el anticuerpo también se unirá a otras moléculas; el aspecto importante para la validez de un inmunoensayo que utilice el anticuerpo es que la unión del anticuerpo a las moléculas que no son el objetivo sea a un nivel relativamente bajo. La reactividad cruzada de esta unión no pertinente con moléculas que no son el objetivo en el inmunoensayo que incorpora el anticuerpo, a menudo es de menos de aproximadamente el 1% y con frecuencia no se puede medir. El anticuerpo se une a la mitraginina y tiene reactividad cruzada sustancial con 8-desmetilmitraginina. Por sustancial se entiende al menos el 10%, preferentemente al menos el 30%, muy preferentemente al menos el 50% de reactividad cruzada con respecto a la mitraginina, la cual proporciona un valor de reactividad cruzada del 100%. El anticuerpo también se une a otros

10 metabolitos que corresponden con la mitraginina modificada de forma estructural en la posición 8.

En una realización adicional los anticuerpos se caracterizan por haberse obtenido de un inmunógeno de estructura

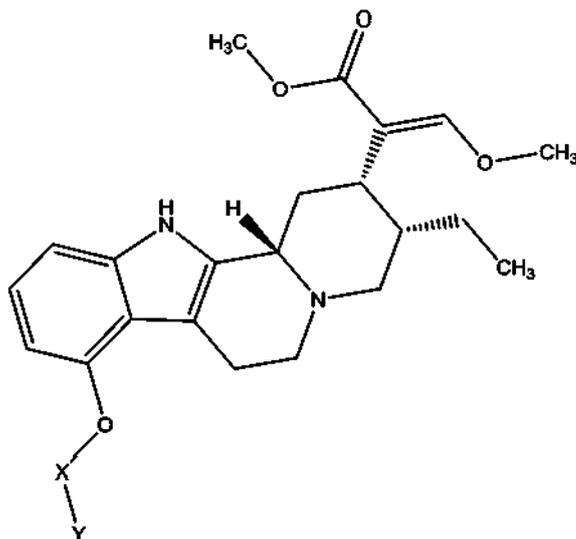


Estructura I

15 en la cual X es un grupo espaciador orgánico -Q-Z-, en los cuales Z es un grupo de entrecruzamiento seleccionado de un radical alquileo saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, de cadena ramificada o lineal, de C₁-C₁₀, preferentemente uno de C₁-C₅, y Q es, antes de la conjugación con Y, un ácido carboxílico o un éster del mismo, un radical ditiopiridilo, un radical vinilsulfona, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo; Y es un material transportador que confiere antigenicidad que preferentemente es hemocianina de lapa californiana (HLC), o seroalbúmina bovina (BSA) o tiroglobulina bovina (BTG). El grupo espaciador orgánico, como se conoce en la

20 técnica, distancia el material transportador que confiere antigenicidad de la porción del inmunógeno que incorpora al epítipo diana, es decir, la Estructura I menos O-X-Y.

Este distanciamiento del epítipo diana del material transportador que confiere antigenicidad a menudo se efectúa por medio de un grupo de entrecruzamiento, muchos de los cuales están disponibles de forma comercial, por ejemplo, véase Thermo Fisher Scientific Inc. Preferentemente el inmunógeno de Estructura I es



Estructura II

en la cual X e Y son como se describe anteriormente. Un inmunógeno preferente se obtiene de la Estructura II en la cual Z = $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$, Q = ácido carboxílico e Y = BTG, es decir, el hapteno de la Figura 4 (estructura de la parte superior) conjugado a BTG. El anticuerpo preferentemente es específico para la mitraginina y reacciona de forma cruzada con su principal metabolito 8-desmetilmitraginina.

5

Los anticuerpos pueden ser cualquier molécula derivada de inmunoglobulina adecuada (un 'derivado de anticuerpo') tal como, pero sin limitación, un policlonal, monoclonal, humanizado, quimérico, de cadena corta o fragmentos variables monocatenarios. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal. Los anticuerpos de la invención pueden adsorberse o acoplarse de forma covalente a un sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustancia o forma a la cual un anticuerpo o derivado de anticuerpo puede unirse, ya sea a través de enlaces químicos (antes de lo cual el sustrato tiene que activarse de forma química) o de adsorción pasiva a través de atracción recíproca del sustrato y el anticuerpo. Preferentemente, los anticuerpos se enlazan de forma química al sustrato activado de forma química. El sustrato puede ser, por ejemplo, perlas de plástico o magnéticas, placas de microtitulación de poliestireno (placas de ELISA), nitrocelulosa plana o un biochip tal como un biochip de plástico, de vidrio o cerámico de superficie recubierta con un material que facilita la inmovilización de los anticuerpos al sustrato. Los anticuerpos o el sustrato que comprende a los anticuerpos pueden proporcionarse como reactivos discretos listos para usar o incorporarse en un kit que, de forma opcional, tenga otros componentes tales como un conjugado y/o patrones.

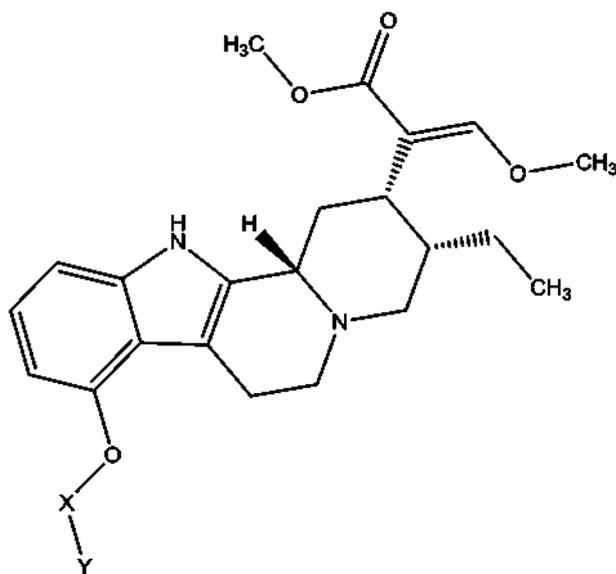
10

15

20

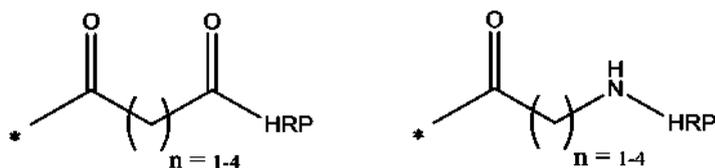
25

En un segundo aspecto la invención describe un procedimiento de inmunoensayo para la detección o cuantificación de la mitraginina, los metabolitos que corresponden a la mitraginina modificados de forma estructural en la posición 8 y los correspondientes glucurónidos y sulfatos metabólicos en una muestra *in vitro* tomada de un individuo, comprendiendo el procedimiento poner en contacto *in vitro* una muestra tomada del individuo con un conjugado y un anticuerpo de la invención, detectar el conjugado unido y deducir a partir del valor del patrón o de los valores del patrón la presencia o cantidad de mitraginina, los metabolitos correspondientes a la mitraginina modificada de forma estructural en la posición 8 y los correspondientes glucurónidos y sulfatos metabólicos. El conjugado preferentemente tiene la estructura



Estructura III

en la cual X es un grupo espaciador orgánico e Y es un agente de marcaje que es detectable. X es -Q-Z-, en el cual Z, unido a O, es un grupo de entrecruzamiento seleccionado de un radical alquileo saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, de C₁-C₁₀, preferentemente de C₁-C₅, y Q es, antes de la conjugación con Y, un ácido carboxílico o un éster del mismo, un aldehído, un grupo amino, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster del mismo, un radical ditiopiridilo, un radical vinilsulfona, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo; Y es cualquier agente de marcaje adecuado que puede seleccionarse de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva o una mezcla de las mismas. Preferentemente, el agente de marcaje es una enzima, preferentemente una peroxidasa, muy preferentemente peroxidasa de rábano picante (HRP). Para -X-Y son particularmente preferentes los grupos



Como alternativa, o de forma adicional, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente. Los conjugados del procedimiento están compuestos de haptenos unidos a los agentes de marcaje. Los haptenos del conjugado son moléculas que pueden unirse a los anticuerpos del procedimiento. El uso de haptenos, conjugados o anticuerpos en el contexto de inmunoensayos es bien conocido en la técnica. Además de la mitraginina, el metabolito a detectar o cuantificar es 8-hidroximitraginina; los conjugados glucuronidados y sulfatados correspondientes también pueden detectarse o cuantificarse. Los diversos derivados estereoisoméricos del Kratom relacionados con confórmers de hidrogeno y del grupo etilo en las posiciones 3- y 12b- de la mitraginina, es decir, especioiginina, especiociliatina y mitraciliatina, y sus metabolitos correspondientes, pueden unirse de forma opcional mediante el anticuerpo de la invención, así como el estrecho análogo estructural painanteína. La muestra procedente del individuo a utilizar para el análisis *in vitro* puede ser cualquier tejido biológico adecuado, por ejemplo, pelo, pero preferentemente es un fluido biológico, en especial sangre completa, suero, plasma u orina. El tejido o fluido biológico puede necesitar preparación para hacerlo adecuado para el análisis.

Además, el anticuerpo de la invención puede utilizarse en un procedimiento de inmunoensayo para detectar o cuantificar la cantidad de mitraginina en una sustancia (que no es una muestra de un paciente *in vitro*) que se sospecha que incorpora mitraginina. Puede ser necesario, en especial para las sustancias que no son líquidas, adaptar la sustancia a una formulación apropiada para el análisis. Por ejemplo, si la sustancia es una mezcla herbácea, antes del análisis mediante inmunoensayo debería realizarse una etapa de extracción en un líquido tal como un disolvente orgánico o agua, para producir una mezcla adecuada para el análisis. Los criterios de detección y cuantificación para una plataforma de inmunoensayo incluyen, como es bien conocido en la técnica, exceder un valor límite/de concentración predefinido o medir el valor equivalente del patrón según se obtiene a partir de una curva patrón (también denominada curva estándar).

5 El formato de un inmunoensayo para la detección o cuantificación de la mitraginina y sus metabolitos puede ser uniplex o multiplex; un inmunoensayo uniplex implica que solo pueden detectarse la mitraginina y sus metabolitos, mientras que un inmunoensayo multiplex implica que pueden detectarse uno o más analitos que no sean la mitraginina y sus metabolitos. En general, en un formato multiplex cada analito se detecta mediante anticuerpos distintos, siendo cada anticuerpo específico para un analito individual o para analitos estructuralmente similares (como con la mitraginina y sus metabolitos).

Un tercer aspecto de la invención es un kit que comprende un anticuerpo de la invención. El kit puede incluir también un conjugado, preferentemente conjugado de Estructura III.

Procedimientos y Ejemplos

10 Metodología general

Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

15 Aunque los haptenos proporcionan epítopos estructurales definidos, no son inmunogénicos por sí mismos y por lo tanto necesitan conjugarse a materiales transportadores, los cuales suscitarán una respuesta inmunogénica cuando se administren a un animal hospedador. Los materiales transportadores apropiados comúnmente contienen segmentos de poli (aminoácidos) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteína. Los ejemplos ilustrativos de materiales transportadores útiles son la seroalbúmina bovina, la ovoalbúmina de huevo, la gammaglobulina bovina, la tiroglobulina bovina, la hemocianina de lapa californiana, etc. Como alternativa, pueden emplearse poli(aminoácidos) sintéticos que tengan un número suficiente de grupos amino disponibles tales como lisina, como pueden emplearse otros materiales poliméricos sintéticos o naturales que porten grupos funcionales reactivos. Además, para producir un inmunógeno pueden conjugarse al hapteno carbohidratos, levaduras o polisacáridos. Los haptenos también pueden acoplarse a un agente de marcaje de detectable tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), a una sustancia que tenga propiedades fluorescentes o a un marcador radiactivo para la preparación de agentes de detección para su uso en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un resto monovalente de fluoresceína o un derivado de la misma. La formación del inmunógeno para la invención descrito en el presente documento implica química de conjugación convencional. Para confirmar que se ha conseguido la conjugación adecuada del hapteno al material transportador, antes de la inmunización cada inmunógeno se evalúa usando desorción/ionización laser UV asistida por matriz-espectroscopía de masas con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOFMS).

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

30 La espectrometría de masas MALDI-TOF puede realizarse utilizando un espectrómetro de masas de láser-desorción Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Puede diluirse una alícuota de cada muestra a analizar en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % acuoso para crear disoluciones de la muestra 1 mg/ml. Pueden analizarse alícuotas (1 µl) utilizando una matriz de ácido sinapínico y seroalbúmina bovina (Fluka) como un patrón externo.

35 Preparación de antisueros

Para generar antisueros policlonales, puede mezclarse un inmunógeno de la presente invención con adyuvante de Freund y la mezcla inyectarse en un animal hospedador, tal como un conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. La oveja es un animal hospedador preferente. Pueden realizarse inyecciones adicionales (de refuerzo) y se toman muestras de suero para la evaluación del título de anticuerpos. Cuando se ha logrado el título óptimo, se extrae sangre del animal hospedador para producir un volumen adecuado de antisuero específico. El grado de purificación del anticuerpo necesario depende de la aplicación pretendida. Para muchos fines, no hay necesidad de purificación, sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo se inmovilizará en un transportador sólido, pueden hacerse tapas de purificación para retirar material no deseado y eliminar la unión no específica.

Desarrollo del inmunoensayo

45 El procedimiento de desarrollo de un inmunoensayo es bien conocido para el experto en la materia. Brevemente, para un inmunoensayo competitivo en el cual el analito diana es una molécula no inmunogénica tal como un hapteno, puede realizarse el siguiente procedimiento: 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. Este procedimiento puede comprender fijar los anticuerpos a un sustrato transportador tal como un transportador sólido de poliestireno o un chip de cerámica. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, obtenidos utilizando técnicas convencionales. La señal emitida en el inmunoensayo es proporcional a la cantidad de agente de detección unido a los anticuerpos, el cual que a su vez es inversamente proporcional a la concentración del analito. La señal puede detectarse o cuantificarse mediante comparación con un patrón.

Ejemplos

55 Los números en negrita en los siguientes Ejemplos corresponden con los números de la Figura 5.

Ejemplo 1: preparación de 8-desmetilmitraginina 2

Se disolvió mitraginina 1 (500 mg, 1,25 mmol) en diclorometano anhidro (50 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió cloruro de aluminio (502 mg, 3,76 mmol) seguido de la adición de etanotiol (1,66 ml, 22,5 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 min y después a temperatura ambiente durante una noche. Los disolventes se evaporaron al vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, metanol al 2 % en diclorometano, se necesitaron 2 separaciones) para proporcionar 229 mg (rendimiento del 48 %) de 8-desmetilmitraginina 2 como un aceite marrón verdoso.

Ejemplo 2: Preparación de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3

Se disolvió 8-desmetilmitraginina 2 (65 mg, 0,169 mmol) en cloroformo anhidro (10 ml) y se añadió anhídrido succínico (74 mg, 0,742 mmol) a temperatura ambiente seguido de la adición de dimetilaminopiridina (DMAP) (45 mg, 0,372 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta la sequedad y el residuo se trituró 2 veces con acetato de etilo y 2 veces con dietiléter, después se secó en nitrógeno para proporcionar 90 mg de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3

Ejemplo 3: Conjugación de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3 con BSA

Se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8,53 mg, 0,041 mmol) y N-hidroxisuccinimida (4,76 mg, 0,041 mmol) a una solución de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3 (18,4 mg, 0,038 mmol) de DMF (1,0 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La diciclohexilurea formada se eliminó por filtración y la solución se añadió gota a gota a una solución de BSA (50 mg, 1,5 µmol) en solución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (5 ml). Después, la mezcla se agitó durante una noche a 4 °C. Después, la solución se dializó frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se liofilizó. Los resultados de la MALDI mostraron que se habían conjugado 23,66 moléculas de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3 a una molécula de BSA.

Ejemplo 4: Conjugación de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3 a BTG

Se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (33,4 mg, 0,162 mmol) y N-hidroxisuccinimida (18,64 mg, 0,162 mmol) a una solución de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3 (65,4 mg, 0,135 mmol) en DMF (1,0 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche. La diciclohexilurea formada se eliminó mediante filtración y la solución se añadió gota a gota a una solución de BTG (150 mg) en solución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (5 ml). Después, la mezcla se agitó durante una noche a 4 °C. Después, la solución se dializó frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C, y se liofilizó.

Ejemplo 5: Conjugación del hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3 con HRP

Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una solución de hemisuccinato de 8-desmetilmitraginina 3 (2 mg) en DMF (0,2 ml). Después de mezclar, esta solución se añadió gota a gota a una solución de HRP (20 mg) en agua (1 ml). Se añadió sulfo-NHS (5 mg) y se incubó la mezcla de reacción en oscuridad a temperatura ambiente durante una noche. El hapteno en exceso se eliminó con columnas dobles PD-10 (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS a pH 7,2. Después, el conjugado hapteno-HRP se dializó durante una noche frente a PBS (101) a pH 7,2 a 4 °C.

Ejemplo 6: Producción de anticuerpo

El inmunógeno (2 mg) se preparó en PBS, mezclado a una proporción de inmunógeno en PBS al 50 % con respecto a adyuvante completo de Freund al 50 % (Sigma, Número de Producto F5881) y se emulsionó pasando de forma repetida la mezcla a través de una punta en el extremo de una jeringa de 1 ml, hasta que estuvo semisólida. La mezcla emulsionada (1 ml) se inyectó por vía intramuscular en la oveja (la dosis de inmunización primaria). Se prepararon inyecciones adicionales (refuerzos) (se prepara 1 mg de inmunógeno en PBS y se mezcla en una proporción de inmunógeno en PBS al 50 % /adyuvante incompleto de Freund al 50 %, Sigma, Número de Producto - F5506) y se inyectaron (1 ml) por vía intramuscular a intervalos mensuales. Para la evaluación del título de anticuerpos se tomaron muestras de suero de forma mensual mediante la recolección de sangre completa a partir de la vena yugular. Antes de la inmovilización en un sustrato sólido (el biochip) el suero se purificó utilizando precipitación por ácido caprílico/sulfato de amonio.

Ejemplo 7: Generación de curvas de estándar de mitraginina y 8-desmetilmitraginina utilizando el antisuero generado

La fracción de IgG del antisuero empobrecida en HRP se inmovilizó en la superficie de un biochip Randox en una región de prueba separada incubando durante aproximadamente 2 h a 37 °C (véase el documento EP0874242). Se empleó un inmunoensayo quimioluminiscente competitivo para el ensayo con mitraginina u 8-desmetilmitraginina en la muestra de ensayo y con hapteno marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Niveles aumentados de mitraginina o de 8-desmetilmitraginina conducen a una unión reducida del hapteno marcado con HRP y, por lo tanto, una reducción de la señal quimioluminiscente emitida. La señal lumínica generada a partir de las regiones de prueba sobre el biochip se detectó utilizando tecnología de formación de imágenes digital y se comparó con la procedente

de una curva patrón. La concentración del analito presente se calculó a partir de la curva patrón. La mitraginina u 8-desmetilmitraginina se prepararon a base de tampón a 40 ng/ml y se diluyó en serie con factor 2 para proporcionar 8 niveles adicionales de 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,313 ng/ml y un blanco a 0 ng/ml. Se añadieron 25 μ l de cada estándar a cada pocillo del soporte de biochip de 9 pocillos con 155 μ l de diluyente de ensayo. Después, se añadió a cada pocillo la peroxidasa de rábano picante marcada con hapteno (120 μ l, Ejemplo 5) y se incubó durante 30 min a 30 °C a 370 rpm utilizando un termoagitador Randox Evidence Investigator. Después de la incubación se decantó el líquido y los pocillos se lavaron con tampón de lavado Evidence, se completaron 6 lavados rápidos y 6 remojos de 2 minutos, después de lo cual el líquido se decantó y el soporte se golpeó ligeramente sobre papel sin partículas de fibra. Se mezclaron Luminol-EV841 y peróxido (Randox Laboratories Ltd) (1:1) para proporcionar el reactivo de fuerza de señal de trabajo y se añadieron a cada pocillo 250 μ l. Después, se incubó durante 2 minutos el soporte de biochip protegido de la luz y se tomaron imágenes utilizando la cámara Evidence Investigator. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Resultados

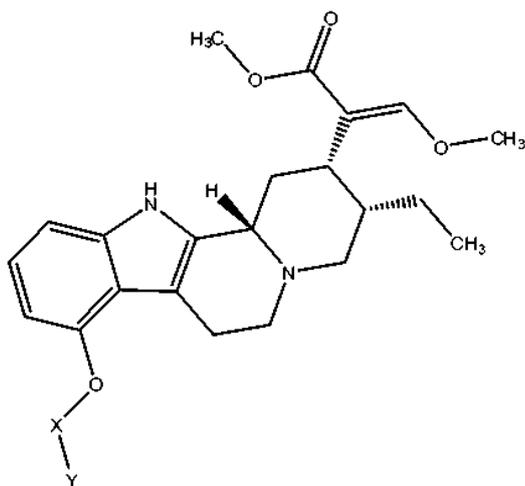
Tabla 1 Datos del ensayo de biochip empleando anticuerpos de la invención (antisueros generados en respuesta al inmunógeno del Ejemplo 5)

ng/ml	Mitraginina			8-desmetilmitraginina		
	A ₄₅₀	CV %	B/B ₀	A ₄₅₀	CV %	B/B ₀
0,000	1,612	4,1	100	1,510	1,0	100
0,313	1,216	6,4	75	1,116	6,0	74
0,625	1,012	6,3	63	0,956	4,6	63
1,250	0,787	7,2	49	0,816	2,7	54
2,500	0,590	10,9	37	0,633	3,7	42
5,000	0,401	10,1	25	0,441	1,4	29
10,000	0,273	7,5	17	0,279	3,2	18
20,000	0,177	13,1	11	0,191	2,4	13
Cl ₅₀ (ng/ml)		1,193			1,532	
% de RC		100,00			77,87	

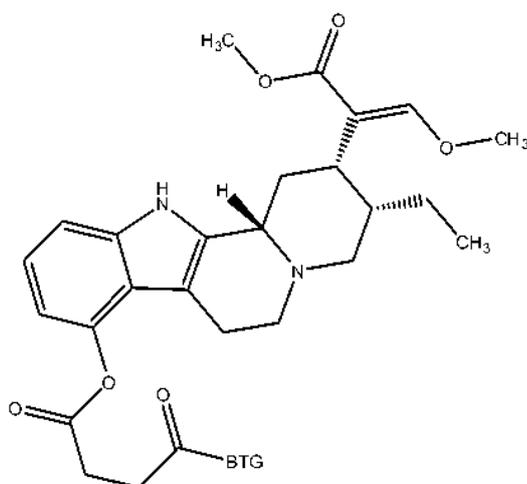
A₄₅₀ = absorbancia a 450 nm; B = absorbancia a 450 nm a concentración de patrón x ng/ml;
 B₀ = absorbancia a 450 nm a concentración de patrón 0 ng/ml; Cl₅₀ = concentración convencional que produce el 50 % de B/B₀; % RC = porcentaje de reactividad cruzada a base de una especificidad del 100 % para la mitraginina.

REIVINDICACIONES

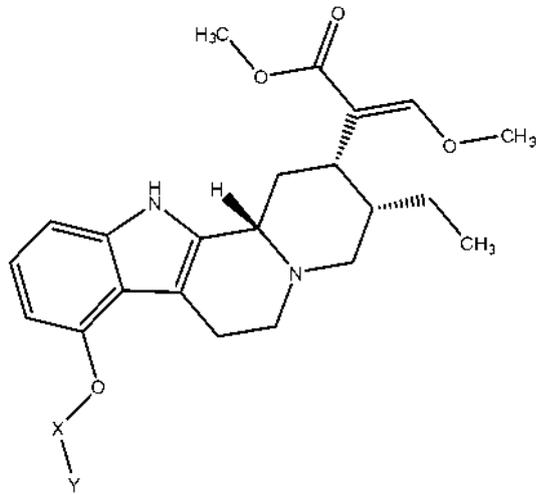
1. Un anticuerpo que se une de forma específica a un epítipo de mitraginina, 8-desmetilmitraginina, 8-sulfonilmitraginina y 8-glucuronidilmitraginina.
2. El anticuerpo de la Reivindicación 1 que se une de forma específica a un epítipo de mitraginina, y 8-desmetilmitraginina.
3. El anticuerpo de las reivindicaciones precedentes adicionalmente **caracterizado por** haberse obtenido a partir de un inmunógeno de estructura



- en la cual
- 10 X es -Q-Z-, en el cual Z es un grupo de entrecruzamiento seleccionado de un radical alquileo saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, de C₁-C₁₀, preferentemente uno de C₁-C₅, y Q es, antes de la conjugación con Y, un ácido carboxílico o un éster del mismo, un aldehído, un grupo amino, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster del mismo, un radical ditiopiridilo, un radical vinilsulfona, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo; Y es un material transportador que confiere antigenicidad, el cual preferentemente es cianina de lapa californiana, tiroglobulina bovina o seroalbúmina bovina.
 - 15 4. El anticuerpo de la Reivindicación 3, que se ha obtenido a partir de un inmunógeno de estructura



5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene el 100 % de reactividad cruzada con mitraginina y más del 10 % de reactividad cruzada con 8-desmetilmitraginina.
- 20 6. Un inmunoensayo de detección o cuantificación de mitraginina, 8-desmetilmitraginina, 8-sulfonilmitraginina y 8-glucuronidilmitraginina, en una muestra, que comprende proporcionar una mezcla de la muestra, un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un conjugado de Estructura III



Estructura III

en la cual

- 5 X es un grupo espaciador orgánico e Y es un agente de marcaje que es detectable; permitir que el anticuerpo se una al conjugado y a mitraginina, 8-desmetilmitraginina, 8-sulfonilmitraginina y 8-glucuronidilmitraginina presentes en la muestra; después detectar la presencia, o medir la cantidad, de conjugado unido al anticuerpo, indicando la presencia o cantidad de conjugado la presencia o cantidad de mitraginina, 8-desmetilmitraginina, 8-sulfonilmitraginina y 8-glucuronidilmitraginina.
7. El inmunoensayo de la Reivindicación 6, el cual detecta o cuantifica mitraginina y 8-desmetilmitraginina.
- 10 8. El inmunoensayo de cualquiera de las Reivindicaciones 6 y 7, en el cual la muestra es una muestra humana *in vitro*, preferentemente sangre, plasma, suero u orina.
9. Un kit que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, y de forma opcional el conjugado de Estructura III de la Reivindicación 6.

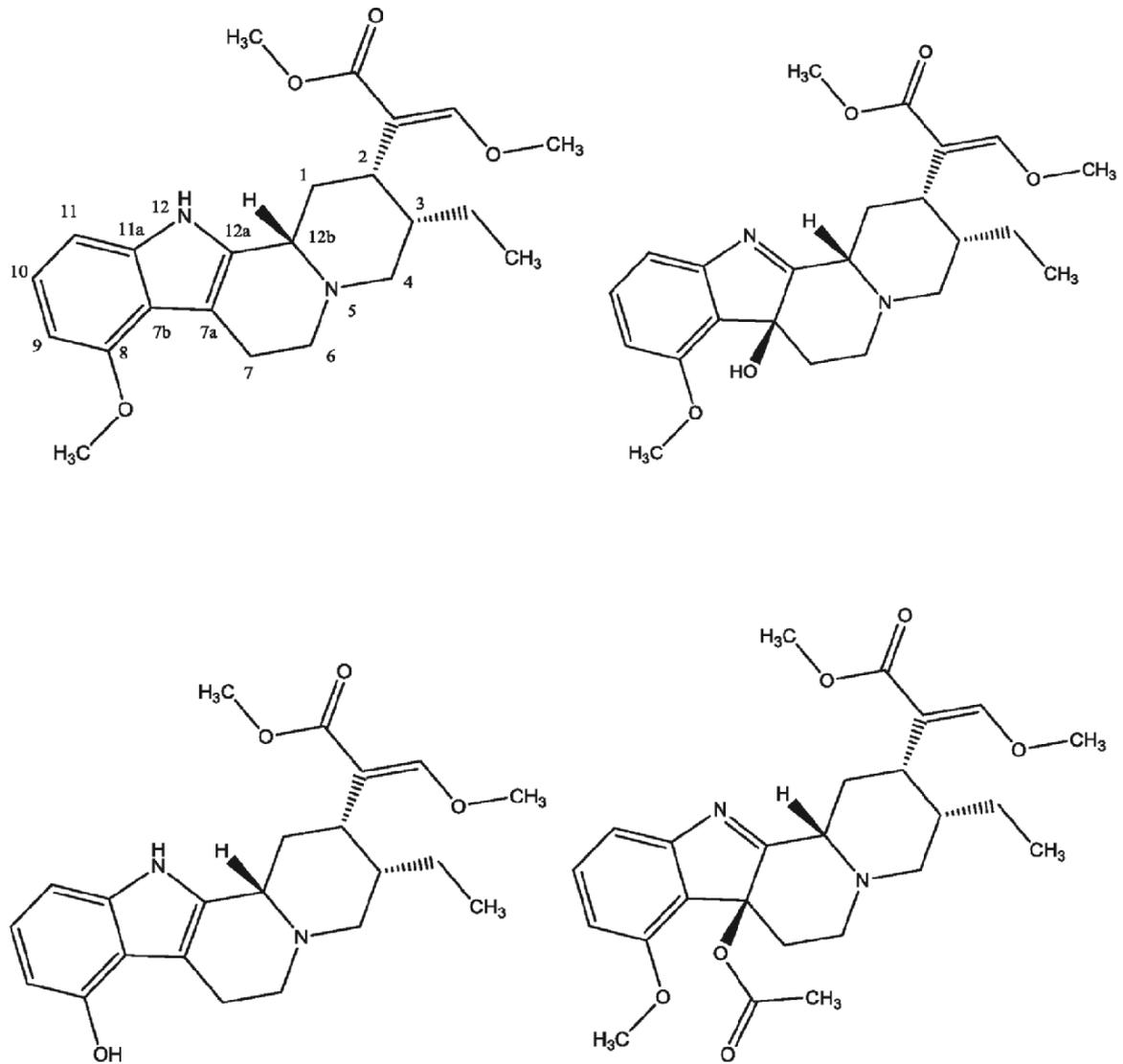


Figura 1 mitraginina con numeración (parte superior izquierda), 7a-hidroximitraginina (parte superior derecha), 8-desmetilmitraginina (parte inferior izquierda), 7a-acetoximitraginina (parte inferior derecha)

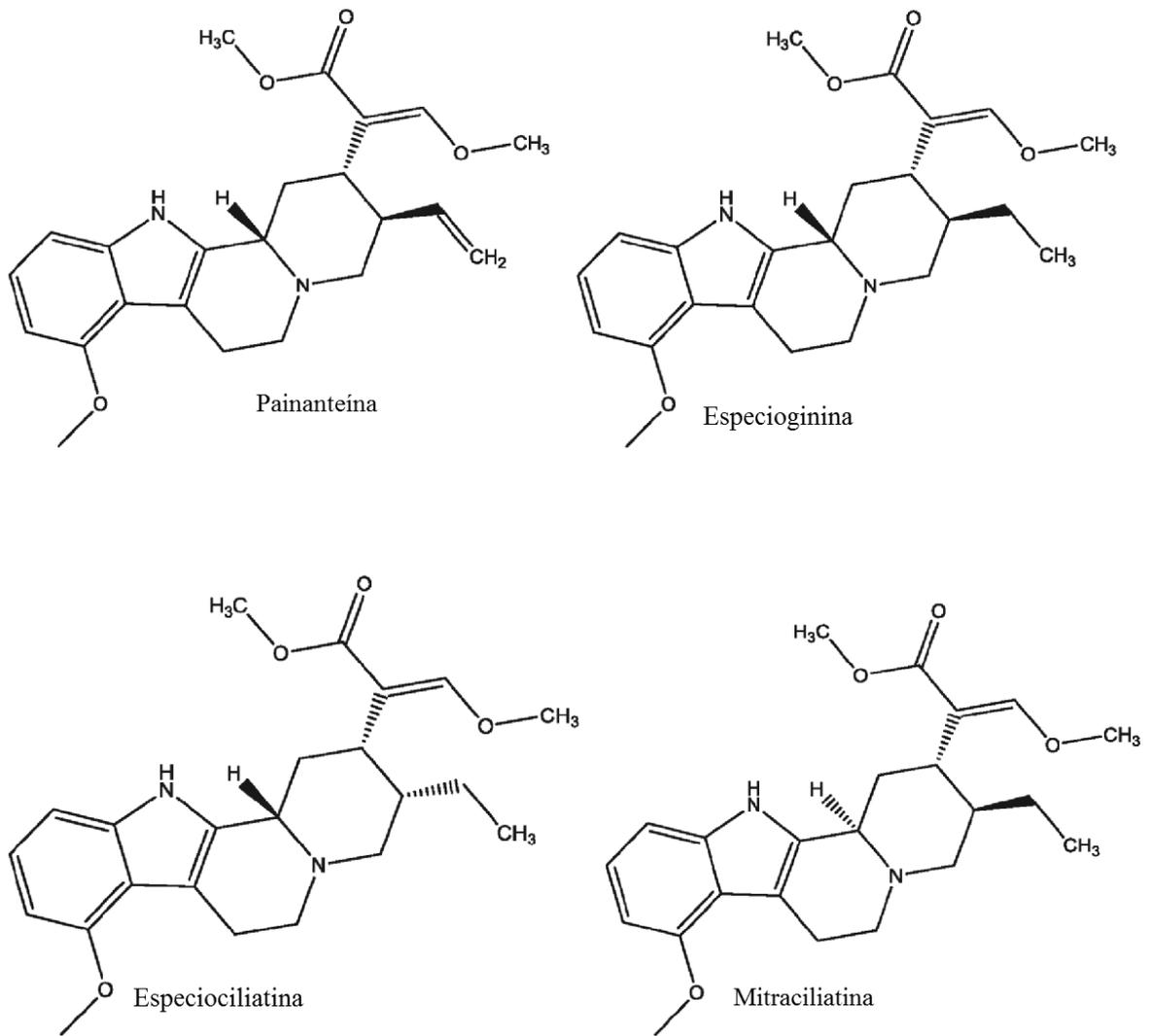


Figura 2

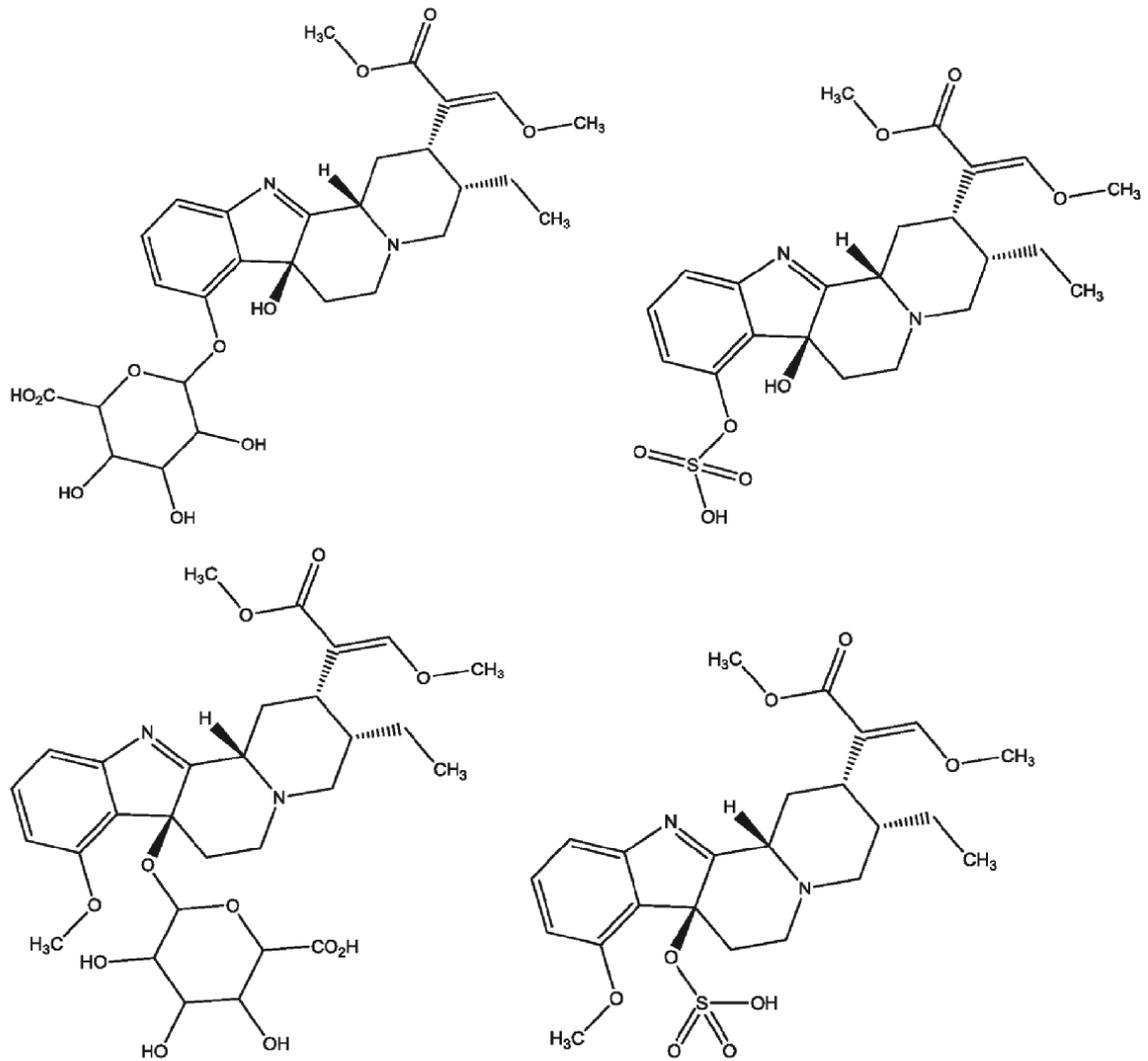


Figura 3

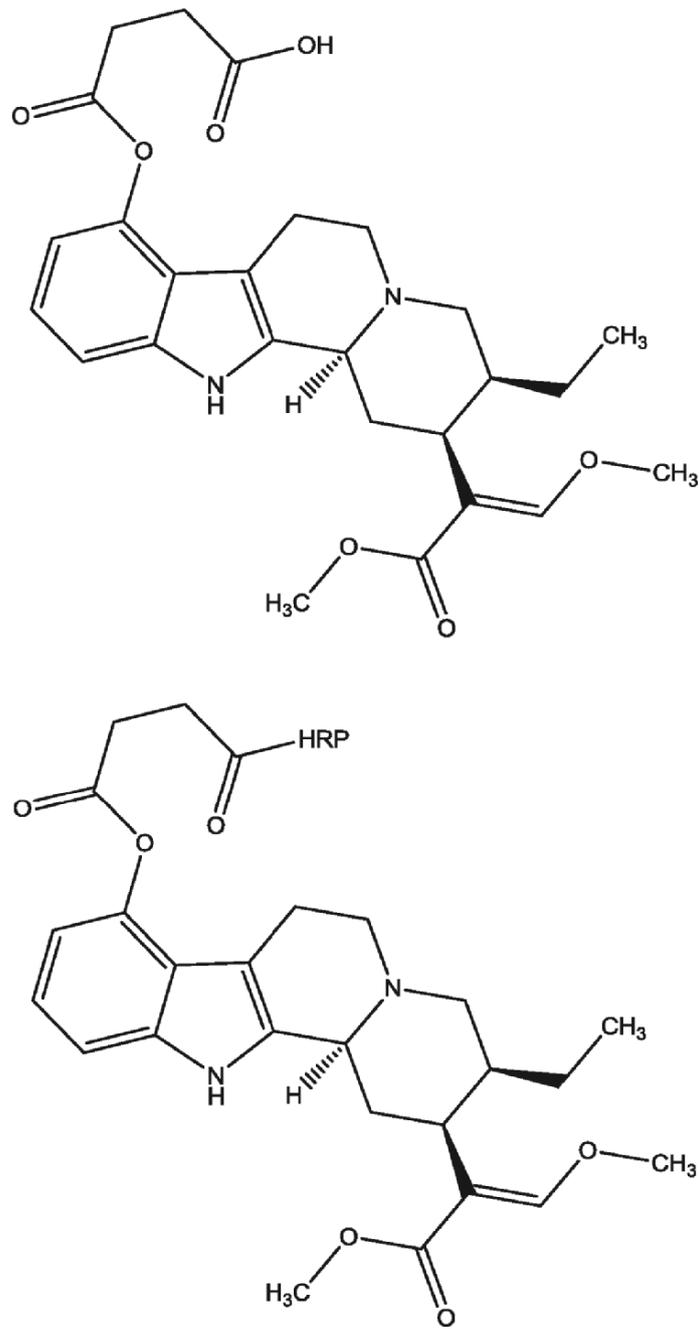


Figura 4

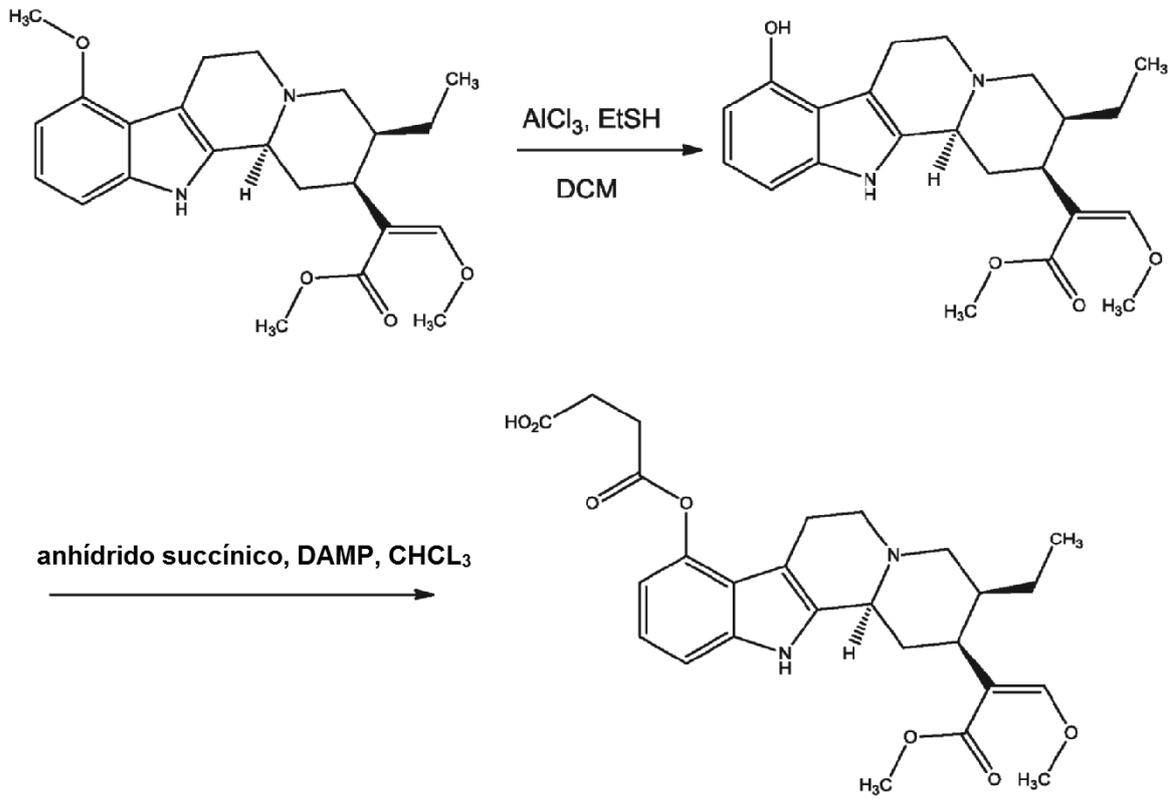


Figura 5