(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 610 471**

(51) Int. CI.:

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: **14.03.2014 E 14160047 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2781527**

(54) Título: **Inmunoensayo para cannabinoides sintéticos basados en ciclopropilindol, metabolitos y derivados de los mismos**

(30) Prioridad:

20.03.2013 GB 201305061

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2017

(73) Titular/es:

RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
55 Diamond Road Crumlin
Crumlin, Antrim BT66 7RP, GB

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo para cannabinoides sintéticos basados en ciclopropilindol, metabolitos y derivados de los mismos

Antecedentes

A menudo se crean nuevas drogas de diseño como alternativas a las drogas ilegales existentes precisamente con la intención de que puedan venderse y comercializarse con apariencia de legalidad.

Los cannabinoides sintéticos, que tienen farmacología similar al tetrahidrocannabinol (THC), el principio psicoactivo del cannabis, se originaron como parte de la investigación sobre los receptores de cannabinoides CB_1 y CB_2. Debido a su actividad en estos receptores, se han aprovechado por los narcotraficantes y usuarios como alternativas legales al cannabis. Los cannabinoides sintéticos se envasan y se venden generalmente (con nombres tales como Spice, K2 e incienso de hierbas) como una mezcla de un medio portador orgánico, habitualmente material vegetal, que normalmente se pulveriza o se mezcla con el compuesto sintético.

Muchos de los compuestos originales encontrados comúnmente en estas mezclas, incluyendo JWH-018 y JWH-073, se han considerado ahora como drogas ilegales en muchos países. Los fabricantes y traficantes clandestinos han respondido a estos cambios en la legalidad produciendo y distribuyendo simplemente productos cannabinoides sintéticos que contienen compuestos ligeramente cambiados en un intento de eludir estas leyes de reciente creación.

Entre los compuestos identificados más recientemente están UR-144 y XLR-11 (Sobolevsky *et al* 2012; Uchiyama *et al* 2012; Kavanagh *et al* 2013). UR-144 y XLR-11 son la nueva generación de cannabinoides sintéticos y son químicamente diferentes de los cannabinoides de primera generación. El anillo de naftaleno en JWH-018 (un cannabinoide sintético de primera generación) se sustituye con un grupo tetrametilciclopropilo para formar UR-144. XLR-11 es la versión fluorada de UR-144. UR-144 ((1-pentil-1H-indol-3-il)(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)-metanona es un potente cannabinoide sintético con unión preferencial al receptor CB_2 periférico con respecto al receptor CB_1 central (Ki 1,8 nM en comparación con Ki 150 nM). XLR-11 ((1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il)(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona) es un compuesto de aminoalquilindol que se espera que sea un mimético de cannabinoide. Se notifica que el grupo tetrametilciclopropilo confiere selectividad por el receptor CB_2 con respecto a CB_1; sin embargo la cadena de N-(5-fluoropentilo) aumenta la unión a ambos receptores.

Se añadió UR-144 a una lista de drogas de clase temporal en Nueva Zelanda el 6 de abril de 2012, mientras que también se añadió XLR-11 el 13 de julio de 2012. Desde el 11 de diciembre de 2012, tanto UR-144 como XLR-11 se han prohibido en el estado de Florida.

Los efectos farmacológicos y toxicológicos de muchos de estos compuestos sintéticos en seres humanos se desconocen y son impredecibles. Se ha notificado que producen agitación, ansiedad, náuseas, vómitos, taquicardia, tensión arterial elevada, temblores, convulsiones, alucinaciones, comportamiento paranoide y falta de respuesta. Se ha propuesto que XLR-11 y sus metabolitos son la causa en casos de lesión renal aguda no explicada (Schwartz *et al*, 2013).

Los métodos analíticos actuales usan espectrometría de masas (EM) conjuntamente con cromatografía de gases (CG) o cromatografía de líquidos (CL). Por ejemplo, Shevyrin *et al*. 2013 usaron CG-EM, CL-EM y resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar una variedad de miméticos del cannabis sintéticos que portan un resto 2,2,3,3-tetrametilciclopropanocarbonilo, incluyendo UR-144 (denominado TMCP-018 en ese estudio), en muestras de drogas de diseño. Una desventaja de tales métodos de detección es que requieren equipos caros y personal altamente cualificado. Se conoce en la técnica que los inmunoensayos son alternativas relativamente rentables, simplistas y rápidas al análisis basado en espectrometría de masas. La patente europea con número de solicitud 2.487.155 proporciona métodos basados en inmunoensayo para la detección de las familias JWH y CP de cannabinoides sintéticos; sin embargo, los anticuerpos proporcionados en esta solicitud no muestran reactividad cruzada significativa con UR-144, sus metabolitos o derivados. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de un ensayo que no sólo sea sensible a las moléculas parentales de UR-144 y XLR-11, sino que también pueda detectar sus metabolitos y derivados clave para permitir mejoras en el análisis clínico y toxicológico forense de la ingesta de estas drogas de diseño en constante evolución.

Bibliografía

Documento EP 2487155 (Randox Laboratories).

Sobolevsky *et al*., (2012) Drug Testing and Analysis, 4:745–753.

Uchiyama *et al*., (2012) Forensic Science International, doi:10.1016/j.forsciint.2012.08.047

Schwartz *et al*., (2013) Centers for Disease Control and Prevention, MMWR; 62:93-98.

Kavanagh *et al*., (2013) Drug Testing and Analysis, doi:10.1002/dta.1456

Shevyrin *et al.,* (2013) Forensic Science International, 226:62-73.

Figuras

Figura 1: Estructuras químicas de los cannabinoides sintéticos UR-144 y XLR-11

Figura 2: Reacciones químicas para la síntesis de ácido N-pentanoico de UR-144 (hapteno-1)

Figura 3: Reacciones químicas para la síntesis de HCTL de ácido N-pentanoico de UR-144 (hapteno-2)

Figura 4: Los principales metabolitos de UR-144

Figura 5: Estructuras químicas de metabolitos y derivados adicionales de UR-144 y XLR-11; (a) análogo N-(5-bromopentilo) de UR-144, (b) análogo N-(5-cloropentilo) de UR-144, (c) isómero N-(4-fluoropentilo) de XLR-11, (d) isómero N-(3-fluoropentilo) de XLR-11, (e) isómero N-(2-fluoropentilo) de XLR-11, (f) metabolito N-(4-hidroxipentilo) de XLR-11, (g) análogo N-(4-pentenilo) de XLR-11, (h) AB-005, (i) AB-796260, (j) A-834735, (k) isómero de azepano de AB-005, (l) compuesto de degradación de XLR-11.

Figura 6: Curva de calibración que muestra absorbancia a 450 nm usando ácido N-pentanoico de UR-144 como patrón en un antisuero que incorpora ELISA producido a partir del inmunógeno I (la línea discontinua muestra el valor CI_{50}).

Sumario de la invención

La invención proporciona haptenos, inmunógenos y anticuerpos que son útiles en la detección de cannabinoides sintéticos basados en ciclopropilindol. Estos anticuerpos pueden incorporarse en métodos, ensayos y kits para la detección de cannabinoides sintéticos basados en ciclopropilindol, específicamente UR-144, XLR-11 y/o sus metabolitos.

Descripción detallada de la invención

A menos que se establezca otra cosa, los términos técnicos tal como se usan en el presente documento se usan según el uso convencional tal como conocen los expertos en la técnica.

UR-144 tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico con el nombre formal (1-pentil-1H-indol-3-il)(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS) 1199943-44-6.

XLR-11 tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico con el nombre formal (1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il)(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona y el número de registro de CAS 1364933-54-9.

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. Esta molécula portadora más grande puede denominarse material portador que confiere antigenicidad (accm). Una vez que el hapteno se conjuga con el accm forma el inmunógeno.

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.

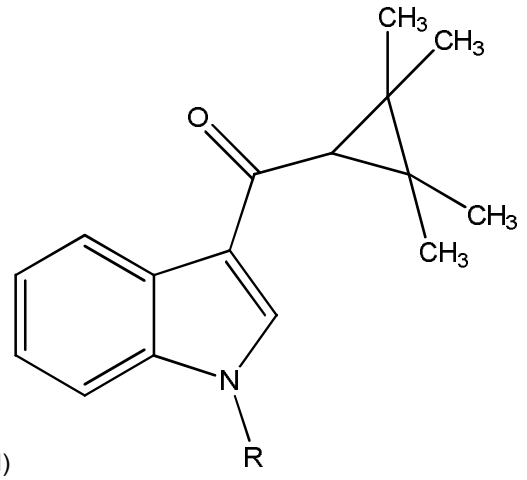
El accm puede ser cualquier material que haga que todo o parte del hapteno sea propenso al reconocimiento por y la unión al anticuerpo. Por ejemplo, el accm puede ser una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. Ejemplos ilustrativos de materiales portadores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

El término “anticuerpo” tal como se usa en el presente documento se refiere a una inmunoglobulina o molécula de tipo inmunoglobulina. Se entenderá que puede usarse cualquier tipo de molécula de inmunoglobulina o fragmento de la misma, por ejemplo anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab, fragmentos scFv y cualquier otro fragmento de unión a antígeno.

Cuando se usa en referencia a un anticuerpo, la palabra “específico” o “especificidad” en el contexto de la presente invención se refiere al analito o analitos que se unen preferiblemente al anticuerpo, tal como se evalúa mediante una métrica adecuada tal como la reactividad cruzada. Con fines de comparación, a un analito con reactividad cruzada

alta generalmente se le da un valor del 100 %, dándoles a los demás analitos un valor relativo a este; además, un experto en la técnica sabe que para que la reactividad cruzada sea de uso práctico, el anticuerpo específico para el analito debe presentar una alta sensibilidad tal como se mide mediante una métrica adecuada tal como la CI_{50}. La CI_{50} es una medida común de la sensibilidad de los anticuerpos para inmunoensayos.

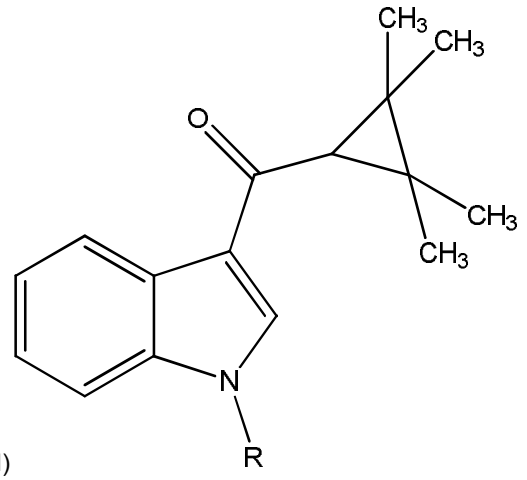
Según un aspecto general de la invención, se proporciona un hapteno que tiene la fórmula general



(I)

en la que, R es H o una cadena hidrocarbonada C_1-C_6 sustituida o no sustituida. Preferiblemente, R es una cadena hidrocarbonada sustituida, más preferiblemente un grupo alquilo sustituido. Estos aspectos de la invención se amplían más adelante.

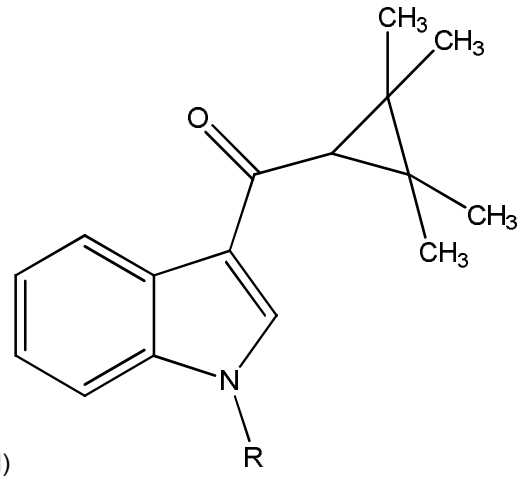
Según otro aspecto general de la invención, se proporciona un inmunógeno que tiene la fórmula (I) conjugado con un material portador que confiere antigenicidad (accm)



(I)

en la que, R es H o una cadena hidrocarbonada C_1-C_6 sustituida o no sustituida. Preferiblemente, R es una cadena hidrocarbonada sustituida, más preferiblemente un grupo alquilo sustituido. La conjugación puede tener lugar directamente o con un grupo de reticulación. Estos aspectos de la invención se amplían más adelante.

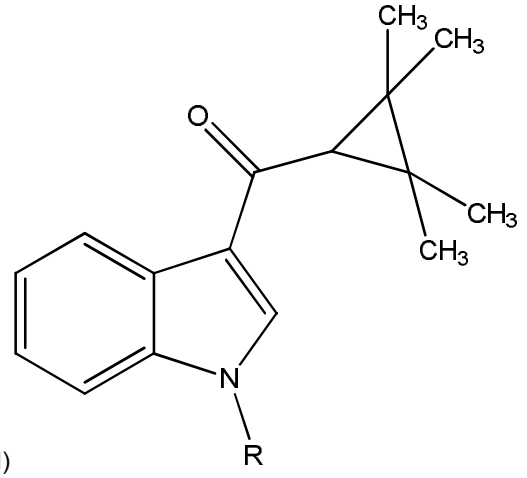
Un primer aspecto general de la invención es un anticuerpo que se une o que puede unirse a al menos un epítopo que tiene la fórmula (I):



(I)

en la que, R es H o una cadena hidrocarbonada C_1-C_6 sustituida o no sustituida. Preferiblemente, R es una cadena hidrocarbonada sustituida, más preferiblemente un grupo alquilo sustituido y en el que el anticuerpo no muestra unión significativa a JWH-098, JWH-022, JWH-398, JWH-210, el metabolito 6-hidroxiindol de JWH-018, el metabolito 5-hidroxiindol de JWH-018, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de JWH-018, RCS-4, RCS-8, AM-1220, AM-2201, AM-694, AM-1241, JWH-015, JWH- 200, JWH-073, JWH-019, JWH-018, JWH-250 y/o el metabolito N-carboxibutilo de JWH- 018.

Un segundo aspecto general de la invención es un anticuerpo que puede derivarse de o que puede producirse contra un inmunógeno, en el que el inmunógeno comprende un hapteno conjugado con un accm, y en el que el hapteno tiene la fórmula (I):



(I)

en la que, R es H o una cadena hidrocarbonada C_1-C_6 sustituida o no sustituida y en la que el anticuerpo no muestra unión significativa a JWH-098, JWH-022, JWH-398, JWH-210, el metabolito 6-hidroxiindol de JWH-018, el metabolito 5-hidroxiindol de JWH-018, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de JWH-018, RCS-4, RCS-8, AM-1220, AM-2201, AM-694, AM-1241, JWH-015, JWH- 200, JWH-073, JWH-019, JWH-018, JWH-250 y/o el metabolito N-carboxibutilo de JWH- 018. Preferiblemente, R es una cadena hidrocarbonada sustituida, más preferiblemente un grupo alquilo sustituido. La conjugación puede tener lugar directamente o con un grupo de reticulación. Estos aspectos de la invención se amplían más adelante.

En ambas de estas realizaciones de anticuerpo, el anticuerpo puede unirse a al menos un epítopo de fórmula (I). De esta manera, el anticuerpo de la invención puede unirse a un epítopo de un analito seleccionado de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144 y/o XLR-11 y/o metabolitos o derivados de los mismos. En las figuras 4 y 5 se muestran metabolitos de UR-144 y XLR-11.

De manera ideal, el anticuerpo es específico para ácido N-pentanoico de UR-144.

Según otro aspecto de la invención, el anticuerpo puede unirse a un epítopo de un analito seleccionado de ácido N-pentanoico de UR-144, N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, N-(4-hidroxipentilo) de UR-144 y 1-(tetrahidropiran-4-ilmetil)-1H-indol-3-il]-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona (A-834735 mostrado en la figura 5 (j)).

Según todas las realizaciones de la invención, R de estructura (I) puede seleccionarse de H, metilo sustituido, etilo sustituido, propilo sustituido o no sustituido, butilo sustituido o no sustituido, pentilo sustituido o no sustituido o hexilo sustituido o no sustituido.

Preferiblemente, R es una cadena hidrocarbonada sustituida, tal como un grupo alquilo sustituido.
Según una realización de la invención, R es un grupo pentilo sustituido, opcionalmente seleccionado de 5-hidroxipentilo, 4-hidroxipentilo, ácido pentanoico o 5-fluoropentilo.
Según una realización más preferida de la invención, R de estructura (I) puede ser ácido pentanoico o un derivado de amida o éster del mismo. Por ejemplo, R puede ser ácido pentanoico o HTCL (homocisteína-tiolactona) de ácido pentanoico.

Alternativamente, R es un grupo metilo sustituido. Preferiblemente, el metilo se sustituye con un pirano sustituido o no sustituido, saturado o insaturado. Según una realización preferida, el metilo se sustituye con tetrahidropirano. De esta manera, R puede ser CH_2-$C_5H_{10}O$ (CH_2-tetrahidropirano). Esta realización se da a conocer en la figura 5 (j) como A-834.735.

Según todas las realizaciones de la invención, el material portador que confiere antigenicidad (accm) puede seleccionarse de una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético.

Opcionalmente, el accm se selecciona de albúmina sérica bovina (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KLH). De manera opcionalmente adicional, el accm se selecciona de BSA o BTG. Opcionalmente, el accm se selecciona de BTG.

Alternativamente, el accm comprende poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina. De manera alternativamente adicional, el accm se selecciona de materiales poliméricos naturales o sintéticos que portan grupos funcionales reactivos. De manera todavía alternativamente adicional, el accm se selecciona de hidratos de carbono, levaduras y polisacáridos.

Según una realización preferida de la invención, R de estructura (I) es ácido pentanoico y el accm es tiroglobulina bovina (BTG).

Se entenderá que el hapteno (es decir, la fórmula (I)) puede conjugarse directamente con o acoplarse directamente al material portador que confiere antigenicidad (accm). En este caso, puede acoplarse ácido N-pentanoico de UR-144 directamente al accm a través de un enlace amida, utilizando un compuesto de carbodiimida tal como N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) para facilitar la reacción. Estas carbodiimidas (tales como EDC o DCC) facilitan la reacción entre el grupo carboxilo (CO_2H de R) en el hapteno y los grupos amino libres en el accm para formar enlaces amida sin grupos de reticulación presentes entre las moléculas conjugadas. De esta manera, tiene lugar el acoplamiento directo a través de la formación del enlace amida. De esta manera, el accm se conjuga directamente con R de estructura I.

Alternativamente, el hapteno (es decir fórmula (I)) puede unirse al material portador que confiere antigenicidad (accm) a través de un grupo de reticulación o agente de reticulación. El grupo de reticulación puede ser cualquier grupo de reticulación convencional usado de manera convencional en este campo. El grupo de reticulación es de manera ideal un grupo de unión funcionalizado que une el accm al hapteno. Preferiblemente, el grupo de reticulación puede comprender o consistir en un resto carboxilo, ditiopiridilo, maleimidilo, amino, hidroxilo, tiol y aldehído. El experto conoce bien el grupo de reticulación en síntesis de inmunógenos. De esta manera, el accm se conjuga a través de un grupo de reticulación con R de estructura I.

Opcionalmente, el anticuerpo de la invención puede unirse a al menos un epítopo del grupo que comprende las moléculas UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144 (también denominado metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144), desalquil-UR-144 y XLR-11. El término “puede unirse a” o “es capaz de unir” tal como se usa en el presente documento significa que en condiciones normales de inmunoensayo, por ejemplo tal como se describe en “Immunoassay: A practical guide” de Brian Law, Tailor and Francis Ltd, ISBN 0-203-48349-9, los anticuerpos se unirán a dichas moléculas.

En una realización adicional, el anticuerpo puede unirse al análogo N-(5-bromopentilo) de UR-144, análogo N-(5-cloropentilo) de UR-144, isómero N-(4-fluoropentilo) de XLR-11, isómero N-(3-fluoropentilo) de XLR-11, isómero N-(2-fluoropentilo) de XLR-11, metabolito N-(4-hidroxipentilo) de XLR-11, análogo N-(4-pentenilo) de XLR-11, AB-005, AB-796260, A-834735, isómero de azepano de AB-005 y compuesto de degradación de XLR-11. El ejemplo 10 muestra buena reactividad cruzada con A-834735.

Se ha encontrado ventajosamente que el anticuerpo de la invención es específico para al menos un epítopo de ácido N-pentanoico de UR-144 y tiene reactividad cruzada con UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144 y XLR-11.

Opcionalmente, el anticuerpo tiene una reactividad cruzada del 100 % con ácido pentanoico de UR-144 y una reactividad cruzada de más del 10 %, opcionalmente de más del 15 %, con el grupo que comprende, pero no se limita a, UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144 y/o XLR-11.

Alternativamente, el anticuerpo tiene una reactividad cruzada del 100 % con ácido N-pentanoico de UR-144 y una reactividad cruzada de más del 100 % con N-pentanol de UR-144 (derivados de N-(5-hidroxipentilo) y N-(4-hidroxipentilo)).

Todavía alternativamente, el anticuerpo tiene una reactividad cruzada del 100 % con ácido N-pentanoico de UR-144 y una reactividad cruzada de más del 25 %, opcionalmente más del 35 % con XLR-11.

Adicional o alternativamente, el anticuerpo puede caracterizarse porque muestra unión no significativa, preferiblemente a 100 ng/ml de agente con reactividad cruzada tal como se define en los ejemplos, a JWH-098, JWH-022, JWH-398, JWH-210, el metabolito 6-hidroxiindol de JWH-018, el metabolito 5-hidroxiindol de JWH-018, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de JWH-018, RCS-4, RCS-8, AM-1220, AM-2201, AM-694, AM-1241, JWH-015, JWH- 200, JWH-073, JWH-019, JWH-018, JWH-250 y/o el metabolito N-carboxibutilo de JWH- 018. Tal como se usa en el presente documento, el término “unión no significativa” puede entenderse que significa cualquier reactividad cruzada baja que no comprometería el ensayo. Opcionalmente, esto corresponde a una reactividad cruzada de menos del 5 % en relación con el analito con mayor reactividad cruzada. Más preferiblemente, la reactividad cruzada es menor del 4 % o el 3 % e incluso más preferiblemente la reactividad cruzada es menor del 2 % o el 1 % en relación con el analito que muestra mayor reactividad cruzada en el ensayo.

Todavía opcionalmente, el anticuerpo tiene una reactividad cruzada del 100 % con ácido N-pentanoico de UR-144, y una reactividad cruzada de más del 100 % para el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144 y A-834735, y una reactividad cruzada de más del 2 % con el grupo que comprende, pero no se limita a, UR-144, XLR-11, desalquil-UR-144, compuesto de degradación de XLR-11 y/o metabolito N-(4-hidroxipentilo) de XLR11.

Adicional o alternativamente, el anticuerpo puede caracterizarse porque tiene una CI_{50} seleccionada de una o más de al menos 3 ng/ml, preferiblemente al menos 3,484 ng/ml para ácido N-pentanoico de UR-144; al menos 22 ng/ml, preferiblemente al menos 22,815 ng/ml para UR-144; al menos 3 ng/ml, preferiblemente al menos 3,191 ng/ml para N-pentanol de UR-144; al menos 19 ng/ml, preferiblemente al menos 19,207 ng/ml para desalquil-UR-144; y al menos 9 ng/ml, preferiblemente al menos 9,454 ng/ml para XLR-11.

Se entenderá que los anticuerpos de la invención pueden producirse contra o pueden derivarse de un inmunógeno conjugado a través de la posición N de una estructura de ciclopropilindol. Los inmunógenos preferidos corresponden a haptenos 1 y 2 tal como se muestra en la figura 3 conjugados con un accm (material portador que confiere antigenicidad).

Inmunógeno I tal como se usa en el presente documento se refiere a hapteno 1 (ácido N-pentanoico de UR-144) conjugado con un accm.

Inmunógeno II tal como se usa en el presente documento se refiere a hapteno 2 (homocisteína-tiolactona (HCTL) de ácido N-pentanoico de UR-144) conjugado con un accm.

Tal como se mencionó anteriormente, el hapteno, tal como los de la figura 3, puede conjugarse directamente con un accm o puede conjugarse con el accm a través de un grupo de reticulación tal como se definió anteriormente.

Opcionalmente, el material portador que confiere antigenicidad (accm) es tal como se definió anteriormente y se selecciona opcionalmente de albúmina sérica bovina (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KLH), poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, lisina y/o materiales poliméricos naturales o sintéticos que portan grupos funcionales reactivos. Preferiblemente, el accm es tiroglobulina bovina (BTG) o albúmina sérica bovina (BSA).

Se ha encontrado que los inmunógenos de la invención producen anticuerpos que pueden unirse a varias moléculas basadas en ciclopropilindol incluyendo UR-144, XLR-11 y metabolitos o derivados de los mismos. En las figuras 4 y 5 se muestran metabolitos a modo de ejemplo de UR-144 y XLR-11. El experto es consciente de que para que estos anticuerpos reconozcan estas moléculas, deben unirse a estructuras particulares o al menos a un epítopo del hapteno (formando parte el hapteno en este contexto del inmunógeno que no es agente de reticulación o accm). Los epítopos a menudo son grupos distintos que incorporan grupos funcionales.

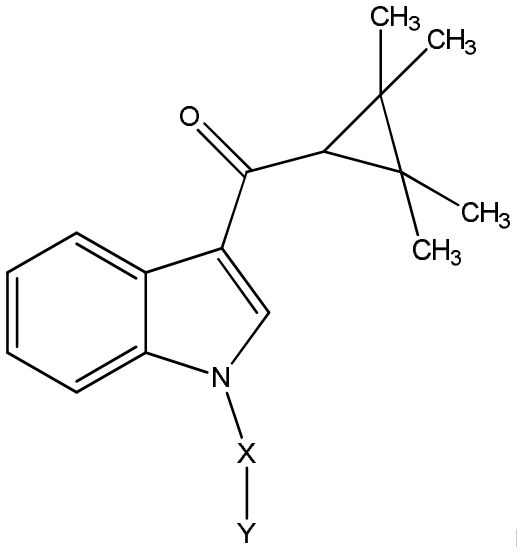
En una realización preferida, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. Sin embargo, el experto entenderá que puede usarse cualquier tipo de molécula de inmunoglobulina o fragmento de la misma, por ejemplo anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab, fragmentos scFv y cualquier otro fragmento de unión a antígeno, encontrándose todos ellos dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos policlonales pueden producirse mediante

cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Puede usarse cualquier animal huésped adecuado, preferiblemente un animal mamífero por ejemplo, pero sin limitarse a oveja, conejo, ratón, cobaya o caballo. Además, los anticuerpos pueden estar en forma de antisueros policlonales.

Un aspecto adicional de la invención es un método de ensayo de detección o determinación de UR-144, XLR-11 y/o metabolitos o derivados de los mismos en una muestra *in vitro* de un individuo o en una disolución derivada de una sustancia sospechosa de contener cannabinoides sintéticos, comprendiendo el método poner en contacto la muestra o disolución 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 de, o la cantidad de, UR-144, XLR-11 o metabolitos en la muestra o disolución.

"Detectar" tal como se denomina en el presente documento significa analizar cualitativamente para determinar la presencia o ausencia de una sustancia, mientras que "determinar" significa analizar cuantitativamente para determinar la cantidad de una sustancia. El agente de detección es una molécula pequeña (generalmente de estructura similar a una molécula que va a detectarse), conjugada con un agente de marcaje que puede unirse a uno de los anticuerpos de la invención. En ocasiones, el agente de detección puede denominarse el conjugado. El agente de marcaje se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radiactiva, o una mezcla de las mismas. Preferiblemente, el agente de marcaje es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, lo más preferiblemente peroxidasa de rábano (HRP). Alternativa o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente. Para los fines de la invención, la muestra del paciente que va a usarse para el análisis *in vitro* puede ser cabello o fluido biológico periférico, pero preferiblemente es sangre completa, suero, plasma u orina.

Preferiblemente, el conjugado o agente de detección usado en los inmunoensayos de la presente invención es de la estructura II:



Estructura II

en la que X es un grupo espaciador orgánico e Y es un agente de marcaje que puede detectarse.

Preferiblemente, el grupo espaciador orgánico X es - Q-Z-, en el que Z, unido a N, es un grupo de reticulación seleccionado de un resto alquileno C_1-C_{10}, preferiblemente C_1-C_5, saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido 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 resto ditiopiridilo, un resto vinilsulfona, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo.

Preferiblemente, el agente de marcaje es peroxidasa de rábano (HRP). Pueden usarse otros agentes de marcaje convencionales seleccionados de una enzima, tal como peroxidasa, una sustancia luminiscente, una sustancia radiactiva o una mezcla de las mismas.

Según una realización preferida de la invención, X de estructura (II) es ácido pentanoico e Y es peroxidasa de rábano (HRP).

En un inmunoensayo preferido de la presente invención, se proporciona un método de inmunoensayo para la detección o la determinación de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144 o XLR-11 y/o metabolitos o derivados de los mismos en una muestra, que comprende las etapas de proporcionar una mezcla de la muestra, un anticuerpo de la invención y un conjugado o agente de detección de la invención; permitir

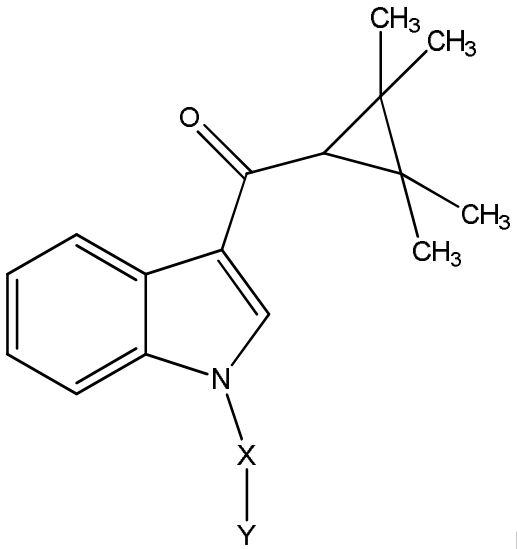
que el anticuerpo se una al conjugado y UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144 o XLR-11 y/o metabolitos o derivados de los mismos presentes en la muestra; y detectar la presencia de o medir la cantidad de conjugado unido al anticuerpo, indicando la presencia o la cantidad de conjugado la presencia o la cantidad de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144 o XLR-11 y/o metabolitos o derivados de los mismos en la muestra.

Opcionalmente, el inmunoensayo de la presente invención también puede detectar o determinar el análogo N-(5-bromopentilo) de UR-144, análogo N-(5-cloropentilo) de UR-144, N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, isómero N-(4-fluoropentilo) de XLR-11, isómero N-(3-fluoropentilo) de XLR-11, isómero N-(2-fluoropentilo) de XLR-11, metabolito N-(4-hidroxipentilo) de XLR-11, análogo N-(4-pentenilo) de XLR-11, AB-005, AB-796260, A-834735, isómero de azepano de AB-005, y compuesto de degradación de XLR-11.

Otro aspecto de la invención es un kit para detectar o determinar UR-144, XLR-11 o metabolitos en una muestra, comprendiendo el kit al menos un anticuerpo y/o al menos un agente de detección de la invención. 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 epítopos estructurales que los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos adicionales pueden detectar o determinar por ejemplo otras familias de cannabinoides sintéticos tales como la familia JWH. Una disposición de este tipo permite un enfoque de multiplex para la detección o la determinación de drogas. El experto en el campo del inmunodiagnóstico conocerá que varios formatos de inmunoensayo alternativos podrían incorporar los anticuerpos de la invención o bien en disolución o bien unidos (por ejemplo unidos covalentemente o “no unidos” electrostáticamente a través de fuerzas de van der Waals) a un sustrato sólido tal como perlas, portaobjetos de vidrio/plástico o un chip (un chip definido como un sustrato plano, pequeño). Un sustrato sólido preferido sobre el que se unen covalentemente anticuerpos de la presente invención es un chip, lo más preferiblemente un chip de cerámica. Un chip de este tipo con anticuerpos unidos puede denominarse un “biochip” tal como se describe en el documento EP1273349, incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad. Por tanto, la invención también proporciona un biochip que comprende anticuerpos de la presente invención para la detección y/o la determinación de UR-144, XLR-11 y metabolitos/moléculas relacionadas.

Según una realización preferida, se proporciona un kit que comprende un anticuerpo de la invención.

Opcionalmente, puede comprender adicionalmente el conjugado de estructura II



Estructura II

en la que X es un grupo espaciador orgánico e Y es un agente de marcaje detectable tal como se describió anteriormente para la estructura II.

Todavía opcionalmente, el kit puede comprender el anticuerpo de la invención que puede unirse a al menos un epítopo de un analito seleccionado de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, XLR-11 y/o metabolitos o derivados de los mismos.

Métodos y ejemplos

Metodología general

Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

Aunque los haptenos proporcionan epítopos estructurales definidos, no son por sí mismos inmunógenos y por tanto necesitan conjugarse con materiales portadores, lo que provocará una respuesta inmunógena cuando se administran a un animal huésped. Los materiales portadores adecuados contienen comúnmente segmentos de poli(aminoácido) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteínas. 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 tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, así como muchos otros materiales poliméricos naturales o sintéticos que portan grupos funcionales reactivos. Además, 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 de rábano), una sustancia que tenga 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. Para confirmar que se ha logrado la conjugación adecuada del hapteno con el material portador, antes de la inmunización se evalúa cada inmunógeno usando espectroscopía de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser UV asistida por matriz (MALDI-TOFMS).

Procedimiento general para análisis con MALDI-TOF de inmunógenos.

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

Preparación de antisueros

Para generar antisueros policlonales, se preparan 2 mg de un inmunógeno de la presente invención en PBS, se mezclan 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 de semisólido requerida. Entonces se inyecta 1 ml de la mezcla en un animal huésped, tal como un conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. Las ovejas son el animal huésped preferido. Se administran inyecciones adicionales (de refuerzo) 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, Sigma, número de producto –F5506) hasta que se logra el título requerido. Se toman muestras de suero para la evaluación del título de anticuerpos.

Brevemente, se recoge sangre aplicando presión en la vena yugular expuesta y se inserta una aguja hipodérmica limpia de calibre 14 para extraer 500 ml de sangre por oveja, por gravedad. Se almacena la sangre a 37 ºC durante un mínimo de una hora antes de que los coágulos se separen del lado de las botellas de centrífuga usando pipetas de 1 ml desechables (aclarado). Se almacenan las muestras a 4 ºC durante la noche.

Entonces se centrifugan las muestras a 4200 rpm durante 30 minutos a 4 ºC. Se separa el suero y se centrifuga de nuevo, a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 ºC, antes de tomarse alícuotas y almacenarse a <-20 ºC. Se extrae la fracción de inmunoglobulina (Ig) de los antisueros a través de la precipitación de inmunoglobulina con ácido caprílico/sulfato de amonio.

Se evalúa el título de anticuerpos 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 ºC durante dos horas. Entonces se lava la placa cuatro veces durante 10 minutos con TBST a concentración de trabajo. Se añaden 50 μl de muestra/patrón (ácido N-pentanoico de UR-144) a los pocillos apropiados por triplicado, seguido por 75 μl de conjugado hapteno-HRP y se incuba a 25 ºC durante una hora. Entonces se lava la placa y se añaden 125 μl de TMB (Randox Laboratories, 4380-15) a cada pocillo y se deja a temperatura ambiente durante 20 min 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 de los anticuerpos.

Cuando se ha logrado el título óptimo, se extrae sangre del animal huésped para producir un volumen adecuado de antisuero específico (en general 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 los anticuerpos requerido depende de la aplicación que se pretenda. Para numerosos fines, no hay requisito de purificación; sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo va a inmovilizarse sobre un soporte sólido, pueden emprenderse etapas de purificación para retirar material no deseado y eliminar unión no específica.

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

Desarrollo del inmunoensayo

El procedimiento para desarrollar un inmunoensayo lo conoce bien el experto en la técnica. Brevemente, 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 anticuerpos es 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 unirse a los anticuerpos. El procedimiento puede comprender fijar dichos anticuerpos séricos a un sustrato de soporte tal como un soporte sólido de poliestireno o un chip de cerámica. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales.

Esto puede llevarse a cabo usando un formato basado en ELISA tal como se describió anteriormente para medir el título de anticuerpos o como un formato basado en biochip. Detalles de cómo se fijan los anticuerpos al biochip se describen en FitzGerald, S. P. *et al*, Clin. Chem. 51(7); 1165-1176; 2005. 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 por comparación con un calibrador.

Ejemplos

(Los números en negrita se refieren a estructuras en la figura 2 o la figura 3)

Ejemplo 1: Preparación de N-desalquil-UR-144 **2**

Se disolvió indol **1** (11,7 g, 100 mmol) en dietil éter (100 ml) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfrió hasta 0 ºC. Se añadió gota a gota una disolución de MeMgBr 3 M (35 ml, 105 mmol) y se permitió que se agitara a temperatura ambiente durante tres horas. Mientras, se disolvió ácido 2,2,3,3-tetrametilciclopropanocarboxílico (14,22 g, 100 mmol) en cloruro de tionilo (100 ml) y se sometió a reflujo durante 90 min, entonces se retiró el disolvente a vacío y se disolvió el residuo en dietil éter (100 ml). Se añadió gota a gota la disolución resultante a la mezcla de reacción de indol a 0 ºC y entonces se permitió que se agitara a temperatura ambiente durante dos horas. Se añadió una disolución de cloruro de amonio (200 ml) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche. Se extrajo la mezcla de reacción con acetato de etilo (3 x 200 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua, salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. Se purificó la mezcla en bruto obtenida mediante cromatografía en columna (gel de sílice: acetato de etilo al 10-30 % en hexano) para dar 8,6 g (36 %) de N-desalquil-UR-144 **2** como un sólido de color crema.

Ejemplo 2: Preparación de éster etílico de ácido N-pentanoico de UR-144 3

Se suspendió hidruro de sodio al 60 % en aceite mineral (597 mg, 12,43 mmol) en dimetilformamida (25 ml) y se añadió N-desalquil-UR-144 **2** (3 g, 5,54 mmol) en porciones a temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 30 min adicionales a temperatura ambiente una vez terminada la adición. Se añadió gota a gota 5-bromovalerato de etilo (2,95 ml, 18,65 mmol) en dimetilformamida (10 ml) a temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se retiraron los disolventes a vacío y se repartió el residuo entre acetato de etilo (200 ml) y agua (150 ml). Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa dos veces con acetato de etilo (2x100 ml). Se combinaron todas las fases orgánicas, se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron hasta sequedad. Se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo al 20 % en hexano) para dar 3,68 g (80 %) de éster etílico de ácido N-pentanoico de UR-144 **3** como un aceite.

Ejemplo 3: Preparación de ácido N-pentanoico de UR-144 4 (hapteno-1)

Se disolvió éster etílico de ácido N-pentanoico de UR-144 **3** (3,68 g, 9,96 mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano (30 ml) y agua (30 ml), a esta disolución se le añadió hidróxido de potasio (1,31 g, 19,92 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el disolvente a vacío, se acidificó el residuo hasta pH 3 y se extrajo tres veces con una mezcla 1:1 de acetato de etilo:tetrahidrofurano (3x100 ml). Se combinaron las fracciones orgánicas, se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo) para dar 2,5 g (74 %) de ácido N-pentanoico de UR-144 **4** (hapteno-1) como un sólido de color blanco.
RMN 13C (DMSO-d6)**: 194,358; 175,099; 137,218; 136,515; 126,696; 123,407; 122,688; 122,467; 119,337; 111,301; 46,633; 42,949; 33,968; 31,643; 29,902; 24,499 (2C); 22,646 y 17,913 (2C).**

Ejemplo 4: Preparación de HCTL de ácido N-pentanoico de UR-144 **5** (hapteno-2)

A una disolución de ácido N-pentanoico de UR-144 **4 (hapteno-1)** (355 mg, 1,02 mmol) en piridina (5 ml) se le añadieron clorhidrato de homocisteína-tiolactona (235 mg, 1,53 mmol) y clorhidrato de EDC (293 mg, 1,53 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el disolvente a vacío y se repartió el residuo en bruto entre agua (10 ml) y acetato de etilo (25 ml). Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2x25 ml). Se combinaron todas las fases orgánicas, se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron hasta sequedad. Se purificó la mezcla en bruto obtenida mediante cromatografía (gel de sílice: acetato de etilo al 50 %-80 % en hexano) para dar HCTL de ácido N-pentanoico de UR-144 **5 (hapteno-2)** (354 mg, 78 %) como un sólido amorfo de color crema.

Ejemplo 5: Conjugación de ácido N-pentanoico de UR-144 **4** (hapteno-1) con BSA

A una disolución de ácido N-pentanoico de UR-144 **4** (hapteno-2) (13,0 mg, 0,038 mmol) en dimetilformamida (DMF) (1,0 ml) se le añadió N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8,53 mg, 0,041 mmol) y N-hidroxisuccinimida (4,76 mg, 0,041 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 (50 mg, 1,5 μmol) en disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (5 ml). Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4 ºC. Entonces se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (tres cambios) durante 24 horas a 4 ºC y se liofilizó.

Los resultados de MALDI mostraron que 21,2 moléculas de hapteno–1 se habían conjugado con una molécula de BSA.

Ejemplo 6: Conjugación de ácido N-pentanoico de UR-144 **4** (hapteno-1) con BTG

A una disolución de ácido N-pentanoico de UR-144 **4** (hapteno-1) (46,1 mg, 0,135 mmol) en dimetilformamida (DMF) (1,0 ml) se le añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (33,4 mg, 0,162 mmol) y N-hidroxisuccinimida (18,64 mg, 0,162 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró la diciclohexilurea formada mediante filtración y se añadió la disolución gota a gota a una disolución de BTG (150 mg) en disolución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (5 ml). Entonces se agitó la mezcla durante la noche a 4 ºC. Entonces se dializó la disolución frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,2 (tres cambios) durante 24 horas a 4 ºC y se liofilizó.

Ejemplo-7: Conjugación de ácido N-pentanoico de UR-144 **4** (hapteno-1) con HRP

Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una disolución de ácido N-pentanoico de UR-144 **4** (hapteno-1) (2 mg) en dimetilformamida (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, preequilibradas con PBS a pH 7,2. Entonces se dializó el conjugado hapteno-HRP durante la noche frente a 10 l de PBS a pH 7,2 a 4 ºC.

Ejemplo 8: Conjugación de HCTL de ácido N-pentanoico de UR-144 **5** (hapteno-2) con HRP modificado con maleimida

Se añadió una disolución de éster de NHS de ácido p-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico (1,84 mg) en dimetilformamida (DMF) (0,045 ml) gota a gota a una disolución de HRP (20 mg) en tampón HEPES 50 mM (0,8 ml) mientras se agitaba. Y entonces se agitó la disolución resultante a temperatura ambiente durante 40 minutos. Se retiró el éster de NHS de ácido p-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico en exceso mediante diálisis frente a solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 en la oscuridad.

Se disolvió HCTL de ácido N-pentanoico de UR-144 (hapteno-2) (2 mg) en dimetilformamida (DMF) (0,2 ml). Se añadieron 0,2 ml de hidróxido de potasio 1 M a la disolución de hapteno anterior y se agitó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Y entonces se añadieron 0,5 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 7,0 para extinguir la reacción; se añadieron 0,15 ml de disolución de HCl (1 M) para llevar el pH a 7,0. Se añadió esta disolución gota a gota a la disolución de HRP modificada con maleimida y se removió la mezcla durante dos horas a TA y durante la noche a 4 ºC. Se retiró el hapteno en exceso con una columna PD-10 (Pharmacia), preequilibrada con solución salina tamponada con fosfato pH 7,2, seguido por diálisis a 2-8 ºC frente al mismo tampón.

Ejemplo 9 – Caracterización de anticuerpos frente a inmunógenos I y II

Se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de unión potenciada con una fracción de IgG de antisuero producido frente al inmunógeno I ó II, diluida en Tris 10 mM, pH 8,5 (125 μl/pocillo). Se determinó la dilución de recubrimiento de anticuerpos apropiada usando técnicas en damero de ELISA convencionales. Se incubó la placa durante la noche a 4 ºC, se lavó cuatro veces durante 10 minutos con solución salina tamponada con Tris que contenía Tween20 (TBST) y se secó golpeándola suavemente. Se aplicaron

disoluciones patrón (ácido N-pentanoico de UR-144) a 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 y 40 ng/ml y se añadieron 50 µl de cada una a los pocillos apropiados. Se añadieron 75 µl de conjugado (hapteno-HRP apropiado) diluido en tampón Tris (pH 7,2) que contenía EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA, a cada uno de los pocillos. También se determinó la dilución apropiada de conjugado usando técnicas en damero de ELISA convencionales. Se incubó la placa a 25 ºC durante una hora. Se retiró el conjugado no unido en exceso lavando seis veces a lo largo de un periodo de 10 minutos con TBST. Se añadieron 125 µl de disolución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo de la placa que entonces se incubó durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se terminó la reacción mediante la adición de 125 µl de H_2SO_4 0,2 M a cada pocillo. Entonces se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación. Se introdujeron los datos en un programa informático llamado "KC Junior" (Biotek). Esto da una curva de ajuste de cuatro parámetros y permite el cálculo de concentraciones entre las series convencionales. Este programa se usa para calcular los valores de CI_{50} dividiendo el valor de densidad óptica (DO) de 0 ng/ml entre 2 y obteniendo el valor de concentración a partir de la curva para esta DO.
Se calculó la reactividad cruzada según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de RC} = CI_{50,\ \text{ácido N-pentanoico de UR-144}} / CI_{50,\ \text{reactivo cruzado}} \times 100$$

donde % de RC es el porcentaje de reactividad cruzada, $CI_{50,\ \text{ácido N-pentanoico de UR-144}}$ es la concentración de ácido N-pentanoico de UR-144 que produce un desplazamiento de señal del 50 % y $CI_{50,\ \text{reactivo cruzado}}$ es la concentración de cannabinoide/metabolito/molécula seleccionada que produce un desplazamiento de señal del 50 %.

En la **tabla 1** se presentan los datos generados a partir de este ensayo usando antisuero producido frente a inmunógeno I.
El antisuero usado para generar estos datos se tomó de la segunda extracción de sangre de hasta 20 extracciones de sangre en total que pueden realizarse y por tanto se prevé que mejore la sensibilidad del anticuerpo a partir de extracciones de sangre posteriores.

Tabla 1 – Caracterización de anticuerpos usando antisuero producido frente a inmunógeno I y agente de detección derivado de hapteno 1 en un formato de ensayo competitivo (RC basada en el 100 % para ácido N-pentanoico de UR-144).

Analito	**% de B/BO**	**CI_{50} (ng/ml)**	**% de reactividad cruzada (RC)**
Ácido N-pentanoico de UR-144	16,8	3,484	100
UR-144	40,5	22,815	15,3
N-pentanol de UR-144	13,0	3,191	109,2
Desalquil-UR-144	38,5	19,207	18,1
XLR-11	24,0	9,454	36,9

B = absorbancia a 450 nm a concentración patrón x ng/ml
B_0 = absorbancia a 450 nm a concentración patrón 0 ng/ml
CI_{50} = concentración patrón que produce el 50 % de B/B_0

Reactividad cruzada
Para determinar la especificidad de los ELISA competitivos, se prepararon disoluciones patrón de una variedad de cannabinoides sintéticos relacionados estructuralmente y sus metabolitos en TBST (solución salina tamponada con Tris y Tween 20). Usando las curvas de calibración generadas y empleando un único nivel de reactivos cruzados, se usaron éstos para determinar la reactividad cruzada de los inmunoensayos con estas sustancias. Los resultados de este estudio se presentan en la **tabla 2**. La tabla 3 muestra la identidad de los compuestos usados.

Tabla 2 – Reactividad cruzada de los ELISA competitivos para moléculas de cannabinoide sintético relacionadas

Reactivo cruzado (100 ng/ml)	**% de B/BO**	**CI_{50} (ng/ml)**	**% de reactividad cruzada (RC)**
JWH-081	97,10	>100	<3,0
JWH-122	97,01	>100	<3,0
JWH-098	93,94	>100	<3,0
JWH-022	91,83	>100	<3,0

JWH-398	88,86	>100	<3,0
JWH-210	95,89	>100	<3,0
6-Hidroxiindol de JWH-018	93,92	>100	<3,0
5-Hidroxiindol de JWH-018	94,61	>100	<3,0
Metabolito N-(5-hidroxipentilo) de JWH-018	87,56	>100	<3,0
RCS 4	80,02	>100	<3,0
RCS 8	88,15	>100	<3,0
AM1220	73,59	>100	<3,0
AM2201	85,58	>100	<3,0
AM694	79,00	>100	<3,0
AM1241	77,96	>100	<3,0
JWH-015	89,77	>100	<3,0
JWH-200	86,38	>100	<3,0
JWH-073	90,44	>100	<3,0
JWH-019	87,30	>100	<3,0
JWH-018	87,89	>100	<3,0
JWH-250	85,90	>100	<3,0
Metabolito N-(carboxibutilo) de JWH-018	89,14	>100	<3,0

Tabla 3 – Identidad de reactivos cruzados mediante número de registro de CAS

Reactivo cruzado	**Número de registro de CAS**
JWH-081	210179-46-7
JWH-122	619294-47-2
JWH-098	316189-74-9
JWH-022	209414-16-4
JWH-398	1292765-18-4
JWH-210	824959-81-1
Metabolito 6-hidroxiindol de JWH-018	1307803-44-6
Metabolito 5-hidroxiindol de JWH-018	1307803-43-5
Metabolito N-(5-hidroxipentilo) de JWH-018	335161-21-2
RCS-4	1345966-78-0
RCS-8	1345970-42-4
AM1220	137642-54-7
AM2201	335161-24-5
AM694	335161-03-0
AM1241	444912-48-5
JWH-015	155471-08-2
JWH-200	103610-04-4
JWH-073	208987-48-8
JWH-019	209414-08-4
JWH-018	209414-07-3
JWH-250	864445-43-2
Metabolito N-(carboxibutilo) de JWH-018	ND

ND=no disponible

Ejemplo 10

Se llevó a cabo un ensayo adicional según el protocolo descrito en el ejemplo 9 usando el inmunógeno I.

En la **tabla 4** se presentan los datos generados a partir de este ensayo usando antisuero producido frente a inmunógeno I.

El antisuero usado para generar estos datos se tomó de la tercera extracción de sangre de hasta 20 extracciones de sangre en total que pueden realizarse.

ESPECIFICIDAD

Tabla 4 – La especificidad de los cannabinoides sintéticos UR144/XLR11 (Spice) mediante ELISA:

Reactividad cruzada de los compuestos cannabinoides sintéticos UR144/XLR11	
Compuesto	**% de reactividad cruzada**
Ácido N-pentanoico de UR144	100
A-834735	111
Metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR144	110
Metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR144	107
A-796260	88
N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR144	81
AB-005	47
XLR11	29
Isómero N-(3-fluoropentilo) de XLR11	29
Análogo N-(4-pentenilo) de XLR11	26
UR144	19
Isómero N-(2-fluoropentilo) de XLR11	16
Análogo N-(5-bromopentilo) de UR144	15
Análogo N-(5-cloropentilo) de UR144	13
Desalquil-UR144	13
Análogo N-(heptilo) de UR144	6
Compuesto de degradación de XLR11	3
Compuesto de degradación de UR144	2
Metabolito N-(4-hidroxipentilo) de XLR11	2
STS135	<1
Análogo N-(5-fluoropentilo) de AKB48	<1
AKB48	<1
AM-1248	<1
3-Carboxiindol de PB-22	<1

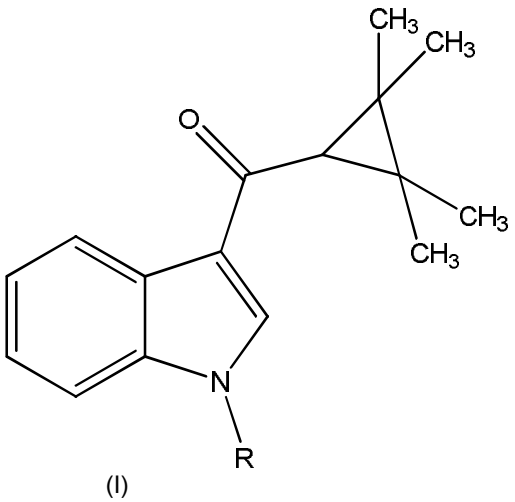
Tabla 5 - Concentración de compuestos que provocan una respuesta negativa en estudios de reactividad cruzada

Compuesto	**ng/ml**
Adamantilcarboxamida de JWH-018	10
Adamantil-JWH-018 (AB001)	100
Ácido N-pentanoico de AB001	100
N-pentanol de AB001	100
N-desalquilo-AB001	100
2-OH-JWH-018 (metabolito 2-hidroxiindol de JWH-018)	100
4-OH-JWH-018 (metabolito 4-hidroxiindol de JWH-018)	100
5-OH-JWH-018 (metabolito 5-hidroxiindol de JWH-018)	100
6-OH-JWH-018 (metabolito 6-hidroxiindol de JWH-018)	100
7-OH-JWH-018 (metabolito 7-hidroxiindol de JWH-018)	100
N-desalquilo-JWH-018 (otro nombre (3-(1-naftoil)indol)	100
Metabolito N-(4-hidroxipentil) de JWH-018 (otro nombre 1-(4-hidroxipentil)-1H-indol-3-il(naftalen-1-il)-metanona)	100
Metabolito N-(5-hidroxipentil) de JWH-018 (otro nombre 1-(5-hidroxipentil)-1H-indol-3-il(naftalen-1-il)metanona)	100
Metabolito ácido N-pentanoico de JWH-018 (otro nombre 5-(ácido 3-(1-naftil)-1H-indol-1-il)pentanoico)	100
JWH-073	100
2-OH-JWH-073 (metabolito 2-hidroxiindol de JWH-073)	100
4-OH-JWH-073 (metabolito 4-hidroxiindol de JWH-073)	100
5-OH-JWH-073 (metabolito 5-hidroxiindol de JWH-073)	100
6-OH-JWH-073 (metabolito 6-hidroxiindol de JWH-073)	100
7-OH-JWH-073 (metabolito 7-hidroxiindol de JWH-073)	100

Metabolito N-(3-hidroxibutilo) de JWH-073 (otro nombre 1-(3-hidroxibutil)-1H-indol-3-il(naftalen-1-il)metanona)	100
Metabolito N-(4-hidroxibutilo) de JWH-073 (otro nombre 1-(4-hidroxibutil)-1H-indol-3-il(naftalen-1-il)metanona)	100
Metabolito ácido N-butanoico de JWH-073 (otro nombre ácido 4-(3-(1-naftil)-1H-indol-1-il)butanoico)	100
JWH-015	100
Metabolito 5-hidroxiindol de JWH-019 (JWH-019-M2)	100
JWH-022	100
JWH-081	100
Metabolito N-(5-hidroxipentilo) de JWH-081	100
JWH-098	100
JWH-122	100
JWH-200 (otro nombre WIN 55,225)	100
JWH-250	100
Metabolito N-(5-hidroxipentilo) de JWH-250	100
Metabolito N-(5-carboxipentilo) de JWH-250	100
JWH-398	100
AM-694	100
AM-1241	100
AM-2201	100
RCS-4	100
RCS-8 (SR-18)	100
Análogo N-(5-fluoropentilo) de AKB48	100
STS135	100

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que puede unirse a al menos un epítopo que tiene la fórmula general (I) :



(I)

en la que, R es H o una cadena hidrocarbonada C_1-C_6 sustituida o no sustituida, y el anticuerpo no muestra unión significativa a JWH-098, JWH-022, JWH-398, JWH-210, el metabolito 6-hidroxiindol de JWH-018, el metabolito 5-hidroxiindol de JWH-018, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de JWH-018, RCS-4, RCS-8, AM-1220, AM-2201, AM-694, AM-1241, JWH-015, JWH-200, JWH-073, JWH-019, JWH-018, JWH-250 y/o el metabolito N-carboxibutilo de JWH-018.

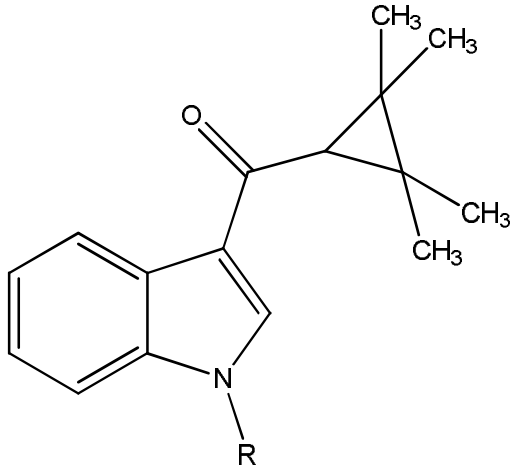
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que R se selecciona de H, metilo sustituido, etilo sustituido, propilo sustituido o no sustituido, butilo sustituido o no sustituido, pentilo sustituido o no sustituido o hexilo sustituido o no sustituido.

3. Anticuerpo según la reivindicación 1, que puede unirse a al menos un epítopo de un analito seleccionado de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, A-834735, A-796260 y XLR-11.

4. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo tiene una reactividad cruzada del 100 % con ácido pentanoico de UR-144 y una reactividad cruzada de más del 10 % con UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144 y XLR-11.

5. Anticuerpo según la reivindicación 1 con una CI_{50} seleccionada de una o más de al menos 3,484 ng/ml para ácido N-pentanoico de UR-144, 22,815 ng/ml para UR-144, 3,191 ng/ml para N-pentanol de UR-144, 19,207 ng/ml para desalquil-UR-144 y 9,454 ng/ml para XLR-11.

6. Anticuerpo según la reivindicación 1, producido contra un inmunógeno, en el que el inmunógeno comprende la fórmula (I) conjugado con un material portador que confiere antigenicidad (accm):



(I)

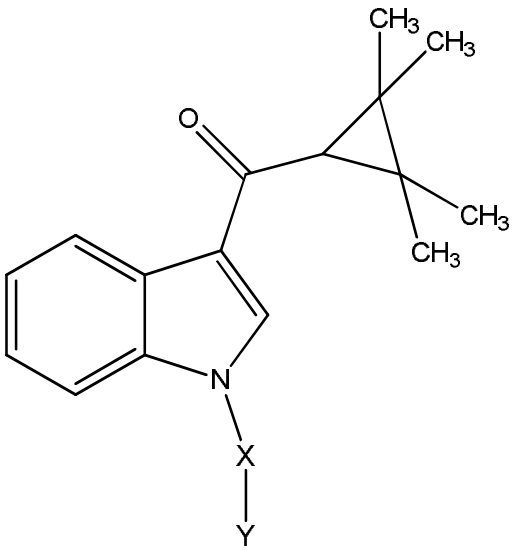
en la que, R es H o una cadena hidrocarbonada C_1-C_6 sustituida o no sustituida, y el anticuerpo puede unirse a un epítopo de un analito seleccionado de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, A-834735, A-796260 y XLR-11.

7. Anticuerpo según la reivindicación 6, en que el material portador que confiere antigenicidad (accm) se selecciona de albúmina sérica bovina (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa californiana (KLH), poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, lisina, y materiales poliméricos naturales o sintéticos que portan grupos funcionales reactivos.

8. Anticuerpo según la reivindicación 6, que puede derivarse de un inmunógeno que consiste en o bien ácido N-pentanoico de UR-144 o bien HCTL de ácido N-pentanoico de UR-144 conjugado con un material portador que confiere antigenicidad.

9. Método de inmunoensayo para detectar o cuantificar UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, A-834735, A-796260 y/o XLR-11 en una muestra, comprendiendo el método las etapas de

   a. proporcionar una mezcla de la muestra, un anticuerpo según la reivindicación 1 y un conjugado de estructura II



Estructura II

en la que

X es un grupo espaciador orgánico e Y es un agente de marcaje que puede detectarse;

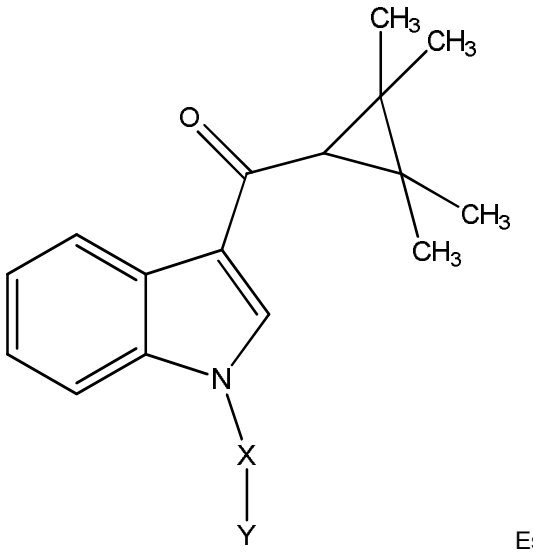
b) permitir que el anticuerpo se una al conjugado y a cualquiera de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, A-834735, A-796260 y XLR-11 presentes en la muestra; y

c) detectar la presencia de o medir la cantidad de conjugado unido al anticuerpo, indicando la presencia o la cantidad de conjugado la presencia o la cantidad de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, A-834735, A-796260 y XLR-11 en la muestra.

10. Método de inmunoensayo según la reivindicación 9, en el que X de la estructura II es - Q-Z-, en el que Z, unido a N, es un grupo de reticulación seleccionado de un resto alquileno C_1-C_{10}, preferiblemente C_1-C_5, saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido; 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 resto ditiopiridilo, un resto vinilsulfona, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo.

11. Método de inmunoensayo para detectar o cuantificar UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, A-834735, A-796260 y/o XLR-11 en una muestra, comprendiendo el método las etapas de

   b. proporcionar una mezcla de la muestra, un anticuerpo según la reivindicación 6 y un conjugado de estructura II



Estructura II

en la que X es un grupo espaciador orgánico e Y es un agente de marcaje que puede detectarse;

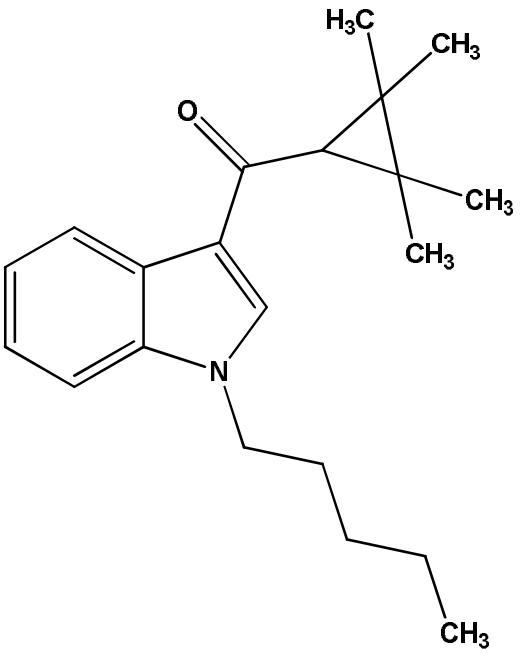
b) permitir que el anticuerpo se una al conjugado y a cualquiera de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, A-834735, A-796260 y/o XLR-11 presentes en la muestra; y

c) detectar la presencia de o medir la cantidad de conjugado unido al anticuerpo, indicando la presencia o la cantidad de conjugado la presencia o la cantidad de UR-144, ácido pentanoico de UR-144, N-pentanol de UR-144, desalquil-UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144, el metabolito N-(5-hidroxipentil)-β-D-glucurónido de UR-144, A-834735, A-796260 y/o XLR-11 en la muestra.

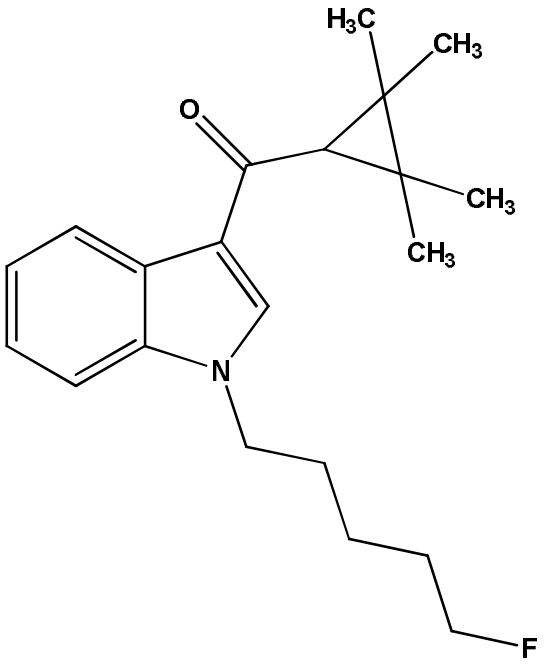
12. Método de inmunoensayo según la reivindicación 11, en el que X de la estructura II es - Q-Z-, en el que Z, unido a N, es un grupo de reticulación seleccionado de un resto alquileno C_1-C_{10}, preferiblemente C_1-C_5, saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido; 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 resto ditiopiridilo, un resto vinilsulfona, un ácido tiocarboxílico o un éster del mismo.

13. Kit que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y opcionalmente un conjugado de estructura II.



UR-144



XLR-11

Figura 1

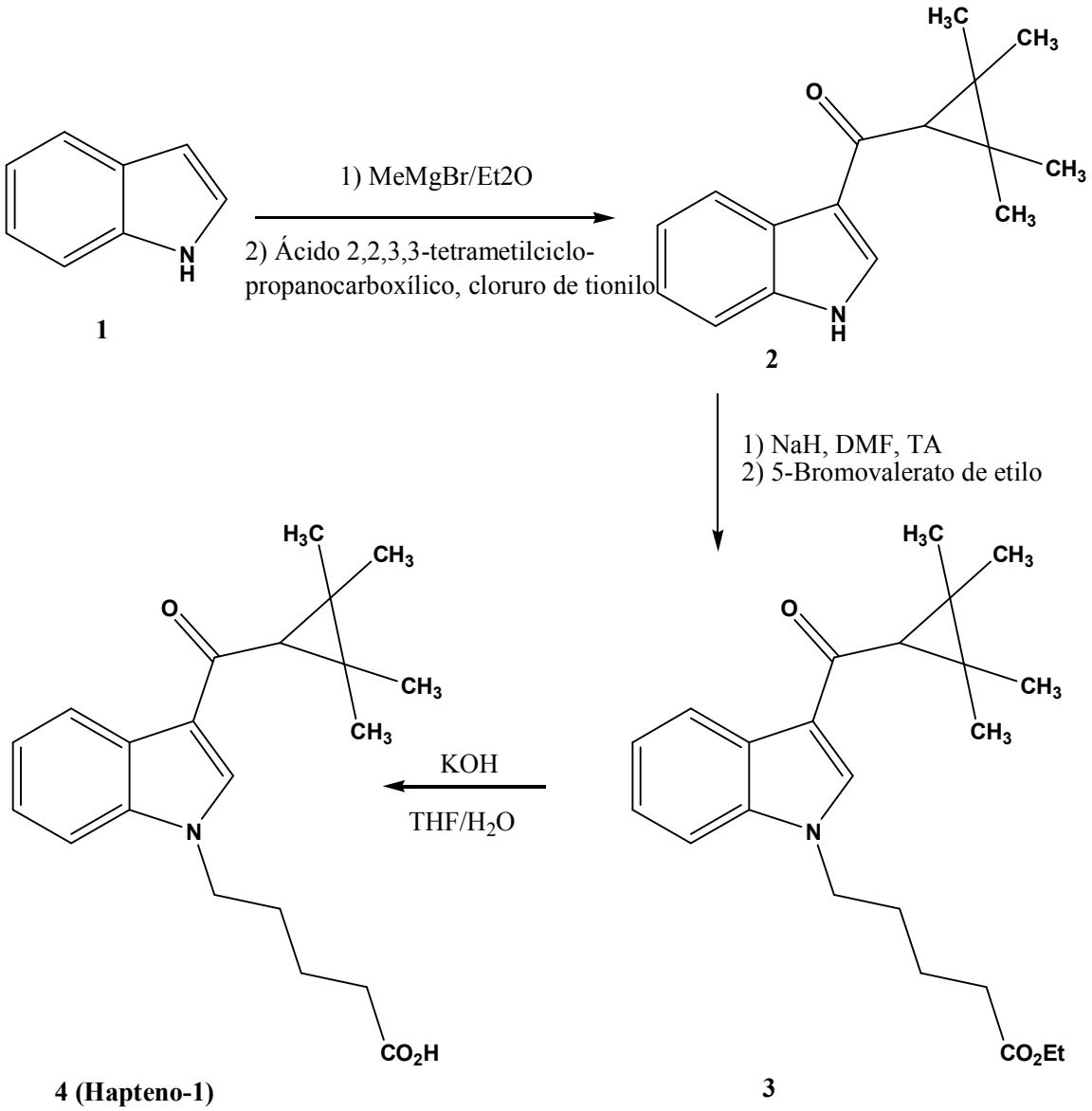
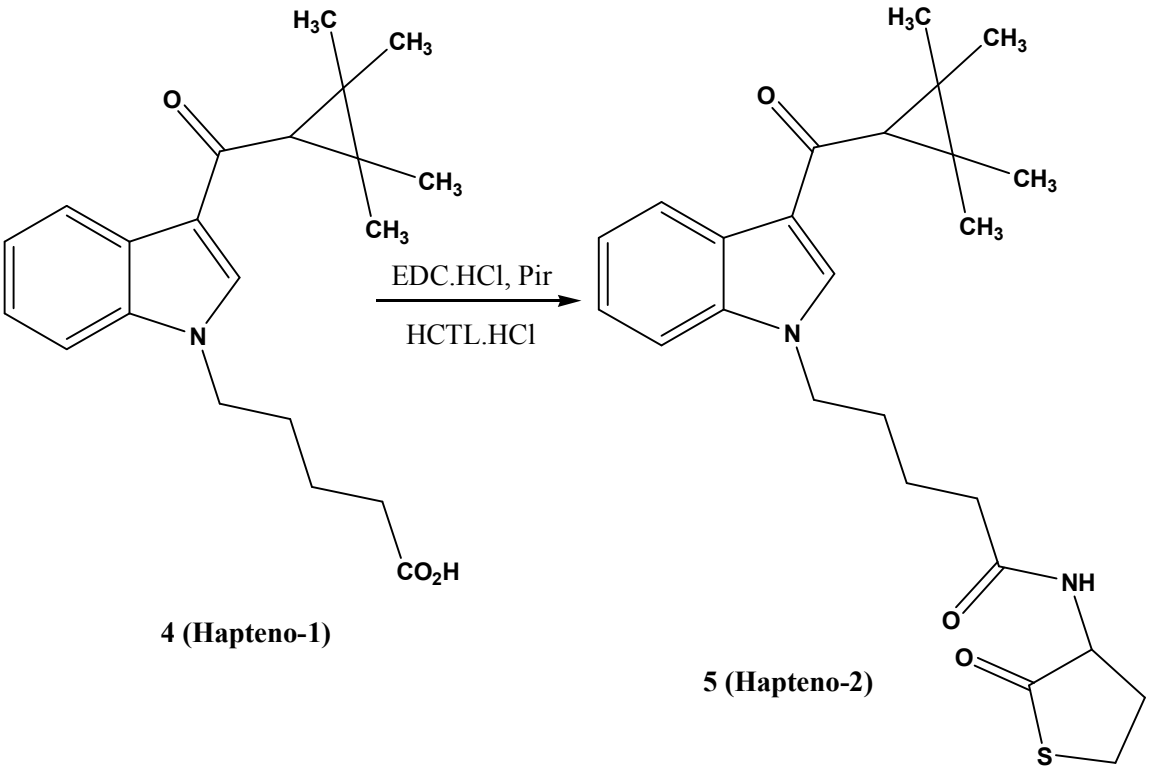

1) MeMgBr/Et2O
2) Ácido 2,2,3,3-tetrametilciclo-propanocarboxílico, cloruro de tionilo
1
2
1) NaH, DMF, TA
2) 5-Bromovalerato de etilo
KOH
THF/H2O
4 (Hapteno-1)
3

Figura 2



4 (Hapteno-1)

5 (Hapteno-2)

Figura 3

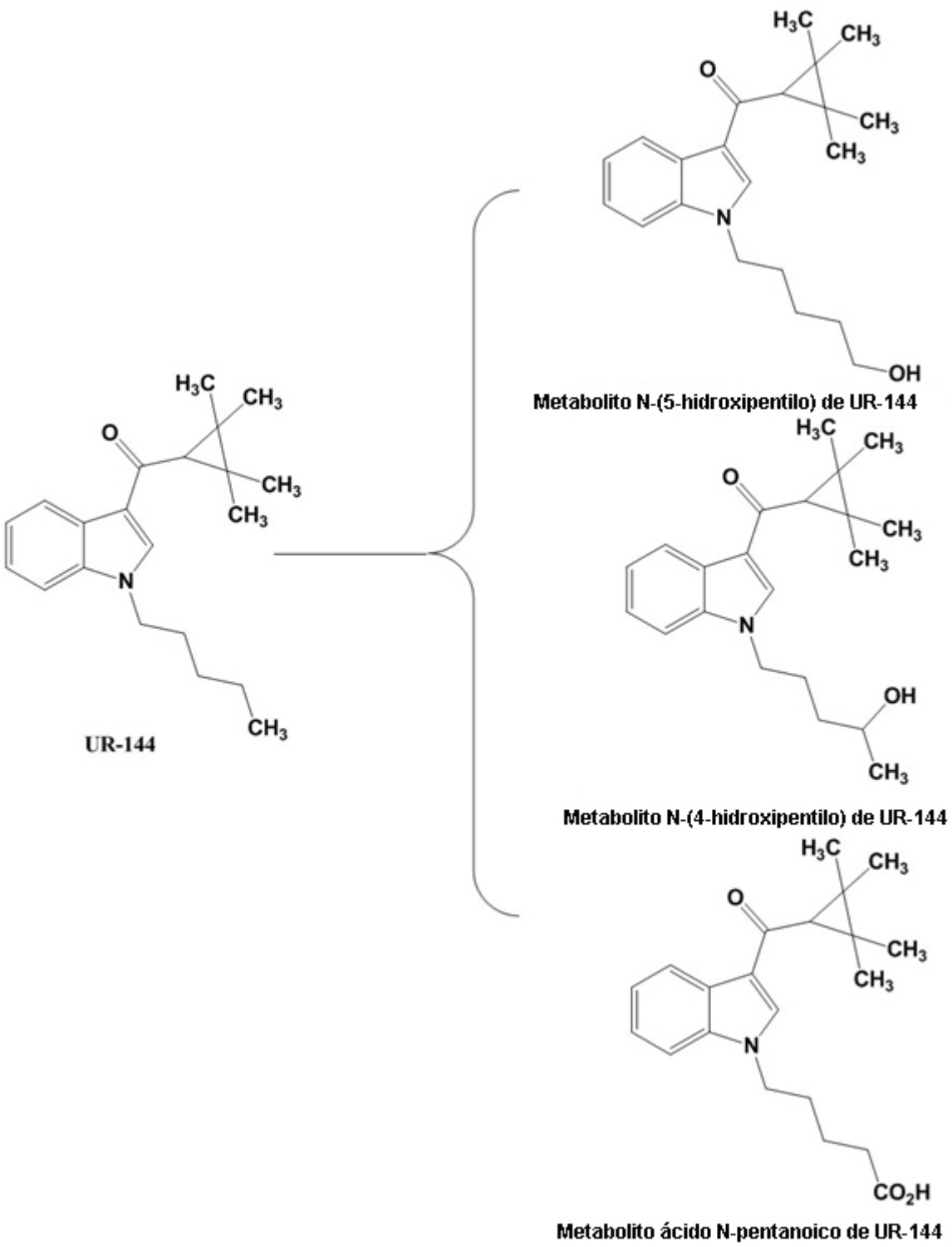

UR-144
Metabolito N-(5-hidroxipentilo) de UR-144
Metabolito N-(4-hidroxipentilo) de UR-144
Metabolito ácido N-pentanoico de UR-144

Figura 4

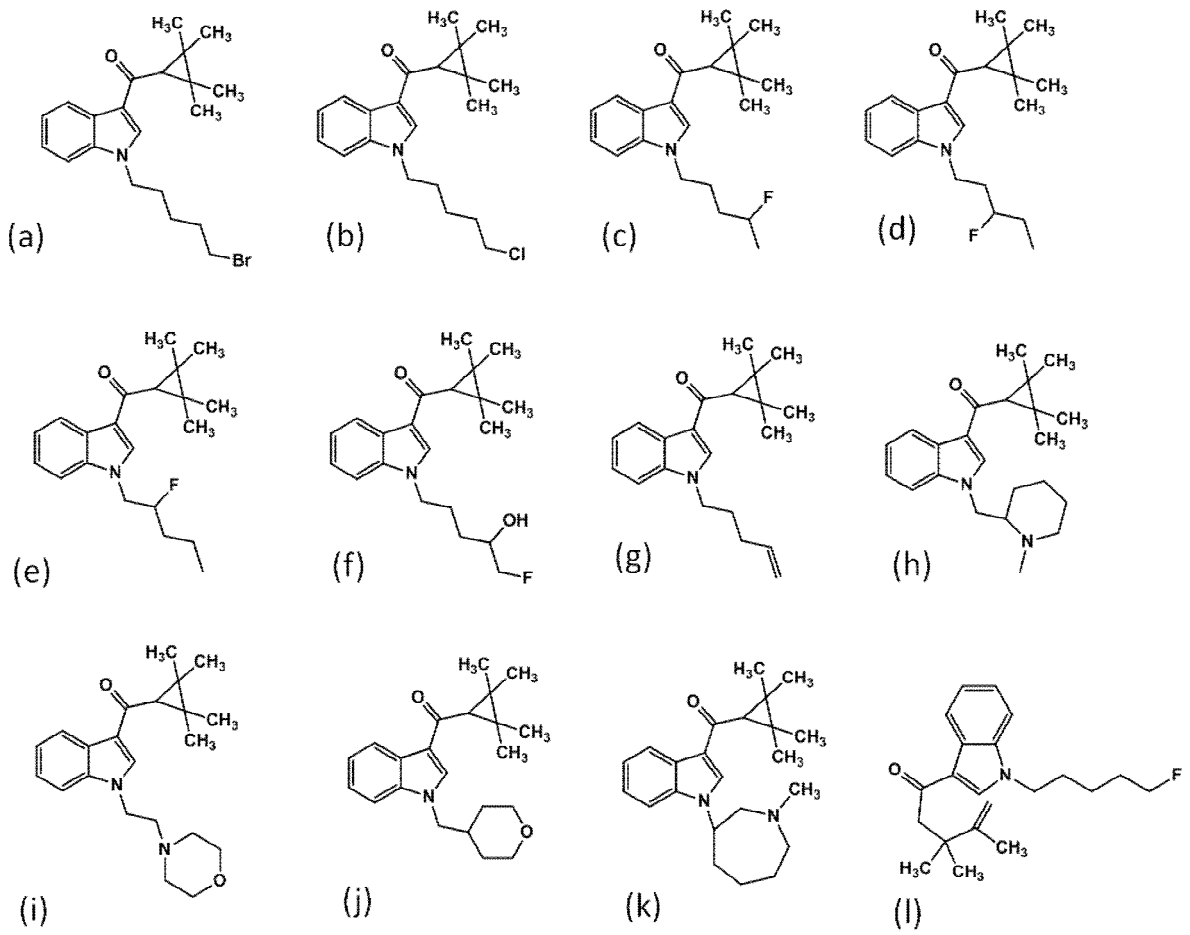


Figura 5

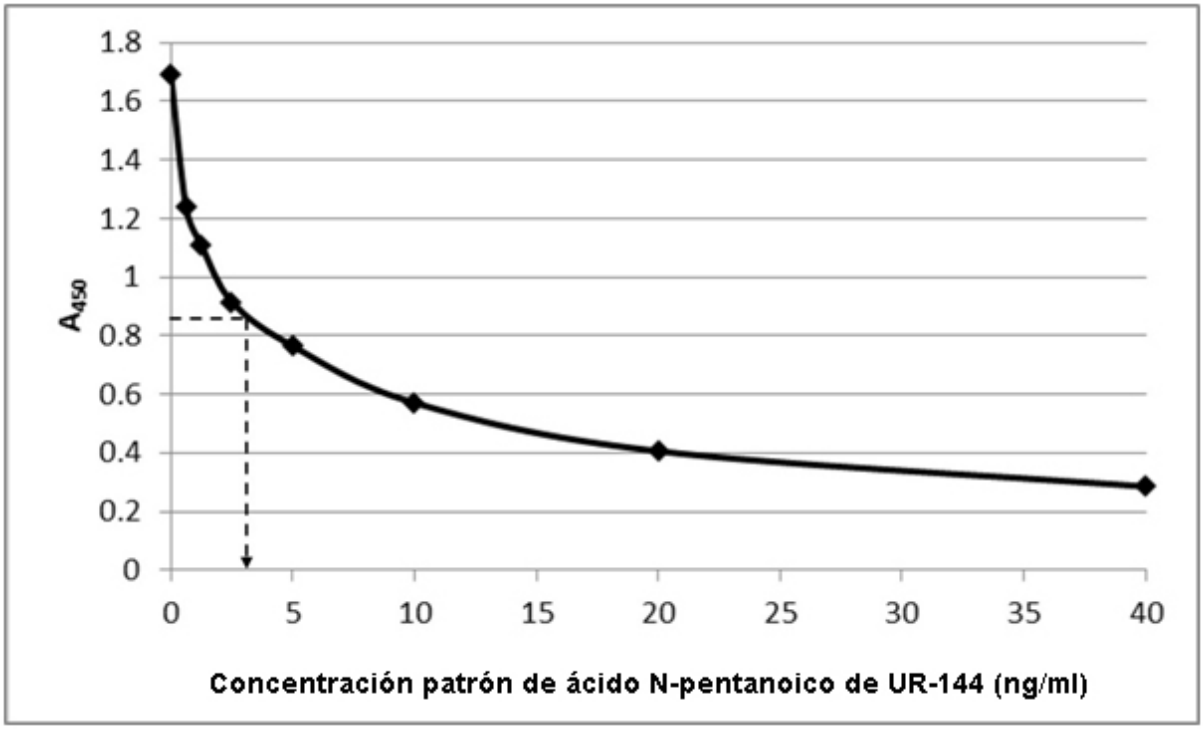

1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
A450
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Concentración patrón de ácido N-pentanoico de UR-144 (ng/ml)

Figura 6