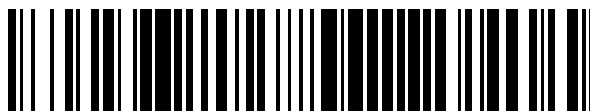


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 827**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07D 295/096 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2013 E 13173828 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2679241**

54 Título: **Ensayo para bencilpiperazinas y metabolitos**

30 Prioridad:

29.06.2012 GB 201211634

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

10.05.2017

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;
LOWRY, PHILIP y
MCCONNELL, IVAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 611 827 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo para bencilpiperazinas y metabolitos

Antecedentes

En años recientes los derivados de piperazina han emergido como una nueva clase de fármacos de diseñador, ganando popularidad especialmente entre la gente joven en el ámbito de la música de baile, donde ellos son conocidos comúnmente como “píldoras de fiesta”. Frecuentemente son comercializados como productos “naturales” o “herbales”, pero de hecho son sustancias químicas totalmente sintéticas. Unida a esta facilidad de disponibilidad y variabilidad del marco legal alrededor del mundo, esto puede crear la concepción equivocada de que estos fármacos son seguros y sin los riesgos asociados comúnmente con los fármacos tradicionales de la calle. Los derivados de piperazina son hallados usualmente en formas ilícitas de dosificación, bien sea como comprimidos o cápsulas, pero ocurren también polvos sueltos y con menos frecuencia, soluciones. Frecuentemente los comprimidos llevan símbolos similares a los vistos en los comprimidos de éxtasis y frecuentemente son vendidas de manera engañosa como éxtasis o como alternativas aparentemente “seguras” y “legales”. Su nombre se deriva del heterociclo piperazina, el cual es un rasgo común y ellas pueden dividirse en dos subcategorías; las bencilpiperazinas, tal como 1-bencilpiperazina (BZP) en sí misma, y las fenilpiperazinas que incluyen 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP) y 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP).

Sinónimos de BZP incluyen 1-(fenilmetil)piperazina, 1-bencil-1,4-diazaciclohexano y N-bencilpiperazina. Los nombres de calcio incluyen A2, Bliss, Charge, Frenzy, Herbal ecstasy, Legal E y Legal X.

La 1-bencilpiperazina es metabolizada en mamíferos mediante adición de hidroxilo al anillo aromático, eliminación del grupo alquilo de N, adición de metilo en O y conjugación. Tsutsumi et al (2006) sugirieron que la p-OH-BZP es el analito objetivo más relevante para uso en análisis forense toxicológico y clínico de ingestión de BZP, dado que retiene la identidad estructural del progenitor. Este estudio, conducido en ratas Wistar, encontró que los niveles urinarios de la BZP progenitora tenía un pico alrededor de 4 horas después de la dosificación, mientras los niveles de los metabolitos de OH-BZP, p-OH-BZP y m-OH-BZP (4-OH-BZP y 3-OH-BZP) alcanzaba niveles máximos alrededor de 8 horas después de la dosificación. Después del pico, ellos hallaron que los niveles de BZP y sus metabolitos que tienen OH caían rápidamente en orina, tornándose indetectable la BZP a 48 horas después de la dosificación, mientras las p-OH-BZP y m-OH-BZP eran detectables hasta a 48 horas después de la dosificación. De las dosificaciones dadas en el estudio, el 6,7% fue excretado de manera no modificada como la BZP progenitora, 25% como p-OH-BZP (el metabolito primario más abundante) y 2% como m-OH-BZP. La BZP puede ser detectada en el plasma dentro de los 30 minutos de una dosificación oral de clorhidrato de BZP, con ocurrencia del pico de concentraciones en plasma entre 60 y 90 minutos después de la ingestión (Anita et al 2009). La BZP tiene una semivida de eliminación de 5-6 horas y la eliminación es completa alrededor de 44 horas.

Los procedimientos analíticos que han sido usados para detectar o determinar derivados de piperazina incluyen GC-MS y LC-MS (Staack & Maurer 2003; Antia et al., 2010). Peters et al., (2010) presentan una revisión de toxicología analítica de fármacos emergentes de abuso, incluyendo piperazinas. Una desventaja de los procedimientos a base de espectrometría de masa es que ellos requieren equipos costosos y personal altamente entrenado. Los inmunoensayos son conocidos en la técnica como alternativas relativamente efectivas en costo, simples y rápidas, a los análisis a base de espectrometría de masas. Se ha mostrado que un inmunoensayo MDMA comercialmente disponible, el ensayo EMIT II plus Ecstasy (SYVA/Dade Behring), tiene reactividad cruzada con BZP pero se requirieron concentraciones de 3.000.000 ng/ml para un resultado positivo (Logan et al., 2010). Neogen tiene un kit disponible ELISA específico para bencilpiperazina (folleto de referencia Neogen Forensic) sin embargo no se suministran datos para la detección de metabolitos tales como el importante metabolito 4-OH ni se indica que el kit tiene la habilidad de detectar estos. Por ello, existe una necesidad por un ensayo de bencilpiperazina que sea no sólo sensible a la molécula progenitora sino que pueda detectar también metabolitos clave que habiliten mejoras en los análisis forenses toxicológicos y clínicos, de la ingestión de esta droga de diseñador.

Referencias

- Antia, U. et al. (2009) Forensic Sci Int, 186(1-3):63-67,
- Antia, U. et al. (2010) JForensic Sci, 55(5):1.311-1.318,
- Fitzgerald, S.P. et al. (2005). Clin. Chem., 51: 1.165-1.176,
- Logan, B.K. et al. (2010) J Anal Toxicol, 34:587-589,
- Peters, F.T. et al, (2010) Ther Drug Monit, 32(5): 532-539,

Staack, R.F. & Maurer, H.H. (2003) J Anal Toxicol, 27(8):560-568,

Tsutsumi, H. et al. (2006) J Anal Toxicol, 30(1):38-43,
http://www.neogen.com/Toxicology/pdf/Forensic_Reference_Brochure.pdf

Dibujos

5 Figura 1: Estructuras químicas de BZP y compuestos relacionados

Figura 2: Reacciones químicas de la síntesis de hapteno-1

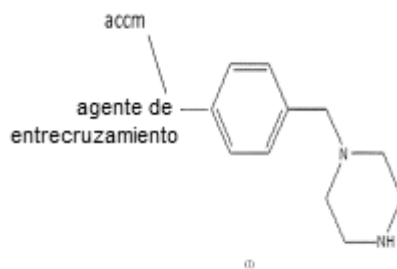
Figura 3: Reacción química de la síntesis de hapteno-2

Figura 4: Reacciones químicas de la síntesis de hapteno-3

Sumario de la invención

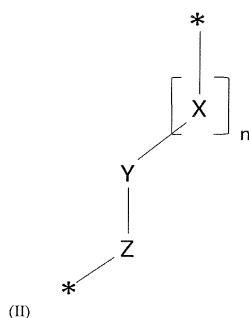
10 La invención describe inmunógenos usados en la producción de novedosos anticuerpos policlonales con propiedades únicas de unión, que superan las limitaciones de los inmunoensayos descritos actualmente, habilitando procedimientos y kits para la detección y determinación cuantitativa de 1-bencilpiperazina y sus metabolitos importantes 4-OH BZP y 3-OH BZP en muestras *in vitro* de paciente. La Figura 1 muestra la estructura de estas y otras moléculas relacionadas detectadas en la presente invención.

15 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se suministra un inmunógeno que tiene la estructura general (I):



El accm (material portador que confiere antigenicidad) es seleccionado de albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de huevo, gamma globulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa(KLH).

20 El agente de entrecruzamiento tiene la estructura general (II):



25 En la que, X, que está unido al anillo aromático, es bien sea un -C(O)-, O o NH; n=0 o 1, Y es un fragmento de alquileo C₁-C₁₀, preferiblemente un C₁-C₆, de cadena recta sustituido o no sustituido, o fragmento arileno, y Z (antes de la conjugación con el accm) es seleccionado de un fragmento carboxi, un ditiopiridilo, una maleimida, un amino, un hidroxilo, un tiol, un tioéster o un aldehído.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se suministra un anticuerpo derivado del inmunógeno del primer aspecto de la presente invención.

30 Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. De modo alternativo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. De otro modo alternativo, el anticuerpo es un fragmento, opcionalmente un fragmento variable de cadena individual.

Opcionalmente, el anticuerpo de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención tiene un IC₅₀ seleccionado de uno o más de aproximadamente 1 ng/ml para 1-bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, aproximadamente 1 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y aproximadamente 3 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina.

- 5 De manera adicional opcionalmente, el anticuerpo de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención tiene un IC₅₀ seleccionado de uno o más de por lo menos 1,4 ng/ml para 1-bencilpiperazina, 0,813 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, 1,137 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1,379 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y aproximadamente 2,646 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina.

- 10 Opcionalmente, el anticuerpo de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención es capaz de unir a por lo menos un epítipo de un analito seleccionado de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina.

- De modo adicional opcionalmente, el anticuerpo tiene un IC₅₀ de aproximadamente 1 ng/ml para 1-bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, aproximadamente 1 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y aproximadamente 3 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina.
- 15

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente divulgación, se suministra un procedimiento de preparación de un anticuerpo capaz de unir por lo menos un epítipo de un analito seleccionado de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina; el procedimiento comprende el aumento del anticuerpo contra el inmunógeno del primer aspecto de la presente invención.

- 20 Opcionalmente, el paso de aumento comprende la preparación de un antisuero. De modo adicional opcionalmente, el paso de aumento comprende la preparación de un antisuero, mediante la inmunización de un animal. De modo todavía adicional opcionalmente, el paso de aumento comprende la preparación de un antisuero mediante inmunización de un animal y aislamiento de anticuerpo del animal.

- 25 Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. De modo alternativo, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. De otro modo alternativamente, el anticuerpo es un fragmento, opcionalmente un fragmento variable de cadena individual.

- Opcionalmente, el anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención tiene un IC₅₀ seleccionado de uno o más de aproximadamente 1 ng/ml para 1-bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, aproximadamente 1 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y aproximadamente 3 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina.
- 30

De modo adicional opcionalmente, el anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención tiene un IC₅₀ seleccionado de uno o más de por lo menos 1,4 ng/ml para 1-bencilpiperazina, de por lo menos 0,813 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, de por lo menos 1,137 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, de por lo menos 1,379 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y de por lo menos 2,646 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina.

- 35 Opcionalmente, el anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención es capaz de unir a por lo menos un epítipo de un analito seleccionado de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina. De modo adicional opcionalmente, el anticuerpo tiene un IC₅₀ de aproximadamente 1 ng/ml para 1-bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, aproximadamente 1 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y aproximadamente 3 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina.
- 40

- De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se suministra un procedimiento para detectar o determinar uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina; el procedimiento comprende la puesta en contacto de una muestra con el anticuerpo de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención o el anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención; detección o determinación de la cantidad de anticuerpo; y atribución de la presencia o cantidad del anticuerpo a la presencia o cantidad de uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina en la muestra.
- 45

- Opcionalmente, el procedimiento comprende el paso adicional de detección o determinación de la cantidad de una etiqueta o detección de un agente capaz de unir al anticuerpo de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención o el anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención, para detectar o determinar la cantidad del anticuerpo.
- 50

También se divulga un ensayo para detectar o determinar uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina; el ensayo comprende el anticuerpo

de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención o el anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención; y medios para detectar o determinar la cantidad del anticuerpo para detectar o determinar la presencia o cantidad de uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina, en la muestra.

- 5 Opcionalmente, el ensayo comprende además un soporte sólido al cual está conjugado el anticuerpo.

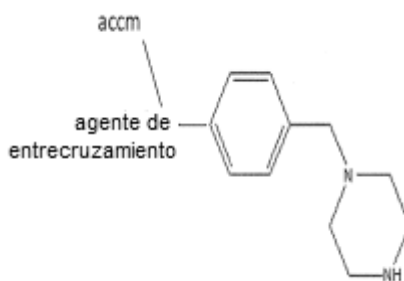
También se divulga un kit para detectar o determinar uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina; el kit comprende el anticuerpo de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención o el anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención.

- 10 Opcionalmente, el kit comprende además instrucciones para el uso.

Descripción detallada

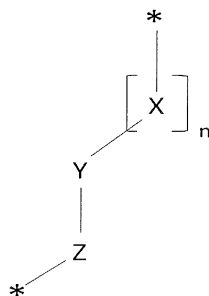
A menos que se establezca de otro modo, los términos técnicos como se usan aquí, son utilizados de acuerdo con el uso convencional como es conocido por aquellos expertos en la técnica.

La invención suministra un inmunógeno de la estructura:



15

en la cual el agente de entrecruzamiento es preferiblemente:



20

en la que, X, el cual está unido al anillo aromático, es bien sea un -C(O)-, O o NH; n=0 o 1, Y es un fragmento de alquileo C₁-C₁₀, preferiblemente un C₁-C₆, de cadena recta, sustituido o no sustituido, o fragmento arileno, y Z (antes de la conjugación con el accm) es seleccionado de un fragmento carboxi, un ditiopiridilo, una maleimida, un amino, un hidroxilo, un tiol, un tioéster o un aldehído.

En el campo del desarrollo de anticuerpos, se considera generalmente que la longitud óptima del grupo de enlace que une el analito que va a ser detectado al accm (longitud de cadena recta y que no incluye átomos de hidrógeno) es aproximadamente 1-10 átomos, más usualmente aproximadamente 1-6 átomos.

25

Antes de la conjugación al accm, la molécula puede ser denominada como un hapteno. Como es usado aquí, el término "hapteno" describe una molécula pre-inmunogénica que estimula la producción de anticuerpos sólo cuando está conjugada a una molécula portadora más grande. Una vez el hapteno está conjugado al accm, forma el inmunógeno. Como se usa aquí, el término "inmunógeno" describe la entidad que induce una respuesta inmune tal como la producción de anticuerpos o una respuesta a célula T en un animal anfitrión. El accm puede ser cualquier material que hace todo o parte del hapteno susceptible al reconocimiento y unión del anticuerpo. Por ejemplo, el accm puede ser una proteína, fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. Son ejemplos ilustrativos de materiales de soporte que confieren antigenicidad, albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo, gamma globulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa (KLH) etc. Preferiblemente el accm es BTG.

30

Un aspecto adicional de la invención son anticuerpos obtenidos de inmunógenos de la invención que se unen a un epítipo de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil) piperazina.

Como es usado aquí, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina o similar la inmunoglobulina. En una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos son cuerpos policlonales, pero la persona entrenada entenderá que puede usarse cualquier tipo de molécula de inmunoglobulina o fragmento de ella, por ejemplo anticuerpos monoclonales, fragmentos de Fab, fragmentos de scFv y cualquier otro fragmento que se une al antígeno, todos los cuales están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos policlonales de la presente invención pueden ser producidos por un procedimiento, como es conocido por las personas entrenadas en la técnica. Puede usarse cualquier animal anfitrión adecuado, preferiblemente un animal mamífero por ejemplo, pero no limitado a un carnero, conejo, ratón, conejillo de indias o caballo.

Cuando se usa en referencia a una anticuerpo, la palabra "específico" o "especificidad", en el contexto de la presente invención, se refiere al analito que está unido preferiblemente al anticuerpo, como se calibra por una métrica adecuada tal como la reactividad cruzada, es decir el analito con la reactividad cruzada más alta es el analito específico del anticuerpo y generalmente se le da un valor de 100%, acordándose para todos los otros analitos un valor relativo a este; adicionalmente, como sabe una persona experta en la técnica, para que la reactividad cruzada sea de uso práctico, el analito específico del anticuerpo tiene que desplegar una elevada sensibilidad según se mide por una métrica adecuada tal como el IC₅₀. El IC₅₀ es una medida común de la sensibilidad del anticuerpo para inmunoensayos. Para la presente invención, una elevada sensibilidad es un IC₅₀ de menos de 50 ng/ml, preferiblemente menos de 10 ng/ml, más preferiblemente alrededor de 1 ng/ml. En la presente invención un IC₅₀ de alrededor de 1 ng/ml se refiere a anticuerpos con valores IC₅₀ de aproximadamente 0,5 ng/ml y más. Se reconoce que para inmunoensayos que utilizan un formato competitivo, el valor IC₅₀ exacto varía ligeramente dependiendo de la naturaleza del agente de detección usado para competir con el analito en la muestra. La elevada sensibilidad de los anticuerpos actuales a BZP y 4-OH BZP, según se mide por IC₅₀, habilita el uso de los anticuerpos en aplicaciones toxicológicas.

Un aspecto adicional de la invención son anticuerpos que tienen un IC₅₀ de aproximadamente 1 ng/ml para 1-bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, aproximadamente 1 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y aproximadamente 3 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina.

Un aspecto todavía adicional de la invención son anticuerpos que tienen un IC₅₀ de por lo menos 1,4 ng/ml para 1-bencilpiperazina, de por lo menos 0,813 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, de por lo menos 1,137 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, de por lo menos 1,379 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y de por lo menos 2,646 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina. Una persona experta en la técnica sabe que variando la concentración de anticuerpo mediante dilución, pueden ajustarse los valores IC₅₀ dependiendo de la aplicación.

La invención suministra también procedimientos para detectar o determinar uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina en una muestra *in vitro* de un individuo o una muestra ambiental que comprende: contacto de la muestra con uno o más agentes de detección y uno o más anticuerpos de la invención; detección o determinación de la cantidad del uno o más agentes de detección; y deducción de los calibradores, de la presencia de o cantidad de uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina en la muestra. Como se hace referencia aquí, "detección" indica el análisis cualitativo de la presencia o ausencia de una sustancia, mientras que "determinación" indica el análisis cuantitativo de la cantidad de una sustancia. El agente de detección es una molécula pequeña (generalmente de estructura similar a una molécula que va a ser detectada), conjugada con un agente de etiquetado/detección que es capaz de unirse a uno de los anticuerpos de la invención. El agente de etiquetado es seleccionado de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva o una mezcla de ellas. Preferiblemente, el agente de etiquetado es una enzima, preferiblemente una peroxidasa, más preferiblemente peroxidasa de rábano picante (HRP). De modo alternativo o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente. Para los propósitos de la invención, la muestra de paciente que va a ser usada para el análisis *in vitro* puede ser cabello o un fluido biológico periférico, pero es preferiblemente sangre entera, suero, plasma, u orina.

Un aspecto adicional de la invención es un kit para detectar o determinar uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina, que comprende uno o más anticuerpos de la invención. Opcionalmente, el kit puede contener uno o más agentes de detección y uno o más calibradores.

Procedimientos generales, ejemplos y resultados

Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

Aunque los haptenos suministran epítopes estructurales definidos, ellos no son en sí mismos inmunogénicos y por ello requieren ser conjugados con un material soporte, el cual provocará una respuesta inmunogénica cuando sea administrado a un animal anfitrión. Los materiales de soporte apropiados contienen comúnmente segmentos de poli(aminoácidos) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteína. Son ejemplos ilustrativos de materiales de soporte útiles albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo, gamma globulina bovina, tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa (KLH) etc. De modo alternativo, pueden emplearse poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, como pueden ser otros materiales poliméricos sintéticos o naturales que portan grupos reactivos funcionales. La química de acoplamiento usada para preparar un inmunógeno de un hapteno y vehículo de soporte, es una consideración importante para la producción exitosa y la correcta especificidad de los anticuerpos resultantes. La elección de metodología de entrecruzamiento es gobernada tanto por los grupos funcionales presentes en la proteína soporte y el hapteno, como por la orientación del hapteno deseada para la presentación apropiada al sistema inmune. También, pueden conjugarse al hapteno carbohidratos, levaduras o polisacáridos, para producir un inmunógeno. Los haptenos pueden estar también acoplados a un agente de etiquetado detectable tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), una sustancia que tenga propiedades fluorescentes o una etiqueta radiactiva, para la preparación de agentes de detección (conjugados) para uso en los inmunoensayos. La carbodiimida reacciona primero con grupos carboxílicos disponibles de los haptenos para formar un producto intermedio O-acilisourea altamente activo. El grupo carboxílico activado reacciona con la amina primaria para formar un enlace amido, con la liberación del mediador EDC como un derivado soluble de isourea. La sustancia presente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado de ella. La formación de inmunógeno para la invención descrita aquí involucra química convencional de conjugación, como se describe en "Bioconjugation Techniques" por Greg T. Hermanson, Academic Press, páginas 419-455 y "Bioconjugation" por Mohammed Aslam y Alastair Dent, ISBN 1-56159-161-0 (1998) páginas 364-482, con objeto de confirmar que se ha alcanzado la conjugación adecuada del hapteno al material de soporte, antes de la inmunización, se evalúa cada inmunógeno usando espectroscopia de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser UV de matriz asistida (MALDI-TOF MS).

Procedimiento general para análisis por MALDI-TOF de Inmunógenos.

Se ejecutó la espectrometría de masas MALDI-TOF usando un espectrómetro de masas de desorción de láser Voyager STR Biospectrometry Research Station, con extracción retardada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diluyó una alícuota de cada muestra que iba a ser analizada, en ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1% para crear soluciones de muestra de 1 mg/ml. se analizaron alícuotas (1 µl) usando una matriz de ácido sinapínico y se usó como agente de calibración externo albúmina de suero bovino (Fluka).

Preparación de antisuero

Con objeto de generar antisuero policlonal, se preparan 2 mg de un inmunógeno de la presente invención en PBS, se mezcla a una relación de 50% de inmunógeno en PBS con 50% de adyuvante completo de Freund (Sigma, número de producto -F5881) y se realiza emulsión pasando repetidamente la mezcla a través de una punta en el extremo de una jeringa de 1 ml, hasta que alcanza la consistencia semisólida requerida. Se inyecta entonces 1 ml de la mezcla en un animal anfitrión, tal como conejo, oveja, ratón, conejillo de indias o caballo. El animal anfitrión preferido es oveja. Se administran inyecciones adicionales (impulsos) sobre una base mensual (se prepara 1 mg de inmunógeno en PBS y se mezcla a una relación de 50% de inmunógeno en PBS con 50% de adyuvante incompleto de Freund, Sigma número de producto -F5506) hasta que se logra el título requerido. Se toma muestra de suero para evaluación del título de anticuerpo.

Brevemente, se recolecta sangre mediante aplicación de presión a la vena yugular expuesta e inserción de una aguja hipodérmica limpia calibre 14 para retirar por gravedad 500 ml de sangre por oveja. Se almacena la sangre a 37°C por un mínimo de 1 hora antes de separar los coágulos del lado de los tubos de centrifuga, usando pipetas desechables de 1 ml (repicando). Se almacenan las muestras a 4°C durante la noche.

Se someten entonces las muestras a centrifugación a 4.200 rpm por 30 minutos a 4°C. Se retira el suero y se somete nuevamente a centrifugación a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, antes de tomar alícuotas y almacenar a <-20°C.

Se extrae la fracción del inmunoglobulina (Ig) del antisuero vía precipitación de la inmunoglobulina con ácido caprílico/sulfato de amonio.

Se evalúa el título de anticuerpo recubriendo una placa de microtitulación (Thermo Fisher Scientific NUNC, 468667) con anticuerpo (125 µl/pozo) en solución amortiguadora de recubrimiento (10 mM Tris pH 8,5) a 37°C por 2 horas. Se lava entonces la placa 4 veces por 10 minutos con TBST de fuerza de trabajo. Se añaden 50 µl de

muestra/estándar (1-bencilpiperazina) a los pozos apropiados en triplicado, seguido por 75 µl de conjugado de hapteno-HRP y se incubó a 25°C por 1 hora. Se lava entonces la placa y se añaden 125 µl de TMB (Randox, 4380-15) a cada pozo y se deja a temperatura ambiente por 20 minutos en la oscuridad. Se detiene la reacción usando 125 µl de ácido sulfúrico 0,2 M. Se leen las absorbancias a 450 nm con un lector de microplaca ELISA (BIO-TEK Instruments, E1x800) y se calculan los promedios. Entonces puede determinarse la sensibilidad del anticuerpo.

Cuando se ha alcanzado el título óptimo, se realiza sangrado al animal anfitrión para dar un volumen adecuado de antisuero específico (en total esto da como resultado 20 productos de sangrado, con aproximadamente 200 ml de antisuero logrados por sangrado). El grado de purificación del anticuerpo requerido depende de la aplicación que se pretenda. Para muchos propósitos, no hay requerimiento para purificación, sin embargo, en otros casos tales como cuando el anticuerpo va a ser inmovilizado sobre un soporte sólido, pueden tomarse pasos de purificación para remover material indeseado y eliminar unión no específica.

Están disponibles diferentes pasos de purificación si se requiere, incluyendo Precipitación de Inmunoglobulina (como se describe anteriormente), purificación por afinidad específica de Antígeno, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico.

15 Desarrollo del inmunoensayo

El proceso de desarrollo de un inmunoensayo es bien conocido para una persona experta en la técnica. Brevemente, para un inmunoensayo competitivo en el cual el analito objetivo es una molécula no inmunogénica tal como un hapteno, se conduce el siguiente proceso: se producen anticuerpos mediante inmunización de un animal, preferiblemente un animal mamífero, mediante administración repetida de un inmunógeno. Se recolecta el suero del animal inmunizado cuando el título del anticuerpo suficientemente alto. Se añade un agente de detección a una muestra que contiene el analito objetivo, y los anticuerpos aumentados y el agente de detección y analito compiten por unirse a los anticuerpos. El proceso puede comprender la fijación de dichos anticuerpos de suero a un sustrato de soporte, tal como un soporte sólido de poliestireno o una pastilla de cerámica. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales.

Esto puede ser ejecutado usando un formato a base de ELISA, como se describió anteriormente para medir el título del anticuerpo o como un formato a base de un Biochip. En FitzGerald, S. P. et al, Clin. Chem. 51(7); 1.165-1.176; 2.005, se describen detalles de cómo se fijan los anticuerpos al Biochip. La señal emitida en el inmunoensayo es proporcional a la cantidad de agente de detección ligado a los anticuerpos, la cual a su vez es inversamente proporcional a la concentración de analito. La señal puede ser detectada o determinada cuantitativamente mediante comparación con un agente de calibración.

Ejemplos

(Los números en negrilla se refieren a las estructuras en la figura 2 o figura 4)

Ejemplo -1: Preparación 4-hidroxibencilpiperazina 2

A una solución de ácido bromhídrico al 48% en agua (100 ml) se añadió clorhidrato de 4-metoxibencilpiperazina 1 (10 g, 41,2 mM) y se calentó la suspensión a reflujo por 4 horas. Se enfrió entonces la solución hasta temperatura ambiente y se concentró a sequedad para dar un sólido. Se añadió entonces agua al sólido y se agitó la solución por 1 hora. Se filtró entonces el sólido, se lavó con agua y se secó a alto vacío para dar el dibromhidrato de 4-hidroxibencilpiperazina 2 (6,3 g, 43,2%)

Ejemplo - 2: Preparación de N-boc-4-hidroxibencilpiperazina 3

A una suspensión de dibromhidrato de 4-hidroxibencilpiperazina 2 (6 g, 18,9 mM) en diclorometano (150 ml) se añadió TEA (3,15 ml, 22,7 mM) y anhídrido de BOC (4,9 g, 22,6 mM) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se lavó entonces la solución con agua (1x100 ml), salmuera (1x100 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y concentró hasta sequedad. El producto crudo obtenido fue purificado mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice usando etilacetato / hexano (50 / 50) para dar la N-boc-4-hidroxibencilpiperazina 3 (4,1 g, 74,2%).

Ejemplo - 3: Preparación del éster 4

A una suspensión de hidruro de sodio (NaH) (0,551 g, 16,4 mm) en dimetilformamida (DMF) (50 ml) bajo nitrógeno, se añadió gota a gota una solución de N-boc-4-hidroxibencilpiperazina 3 (4,0 g, 13,7 mM) en DMF (25 ml) y se agitó la mezcla y se calentó a 60°C por 1 hora. Se enfrió entonces la mezcla hasta temperatura ambiente y a ella se añadió gota a gota una solución de ter-butil bromoacetato (3,2 g, 16,4 mM) en DMF (25 ml) y se agitó la mezcla y se calentó a 60°C por 4 horas. Se enfrió entonces la solución a temperatura ambiente y se eliminó el DMF bajo vacío. Se añadió etil acetato (200 ml) al producto crudo y luego se lavó con agua (100 ml) y salmuera.

Se secó entonces la solución sobre sulfato de sodio, se filtró y concentró hasta sequedad. El producto crudo obtenido fue purificado mediante cromatografía sobre gel de sílice usando etilacetato/ hexano (1 / 1) para dar el éster 4 (4,0 g, 72%) como un aceite claro.

Ejemplo - 4: Preparación de la sal de ácido 2-[4-(piperazin-1-il-metil)fenoxi] acético y TFA (Hapteno-1)

- 5 A una solución del éster 4 (3,5 g, 8,6 mM) en diclorometano (60 ml) se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (30 ml) y se agitó la solución a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la solución hasta sequedad y se trituró con éter el producto crudo obtenido para dar un sólido blanco del hapteno-1 como sal de TFA, (2,7 g, 86%) como sal de TFA. (Como se ilustra en la figura 2)

Ejemplo 5: Conjugación de hapteno-1 a BSA (Inmunógeno-I)

- 10 A una solución de sal de ácido 2-[4-(piperazin-1-il-metil)fenoxi] acético y TFA (**hapteno-1**) (49,5 mg, 0,15 mM) en DMF (1,0 ml) se añadió N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (33,08 mg, 0,16 mM) y N-hidroxisuccinimida (18,7 mg, 0,16 mM) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó mediante filtración la diciclohexilurea formada y se añadió la solución gota a gota a una solución de BSA (150 mg, 2,3 µmol) en solución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Se agitó entonces la mezcla durante la noche a 4° C. Se realizó
15 entonces diálisis a la solución contra solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) por 24 horas a 4° C, y se congeló.

Los resultados de MALDI mostraron que 11,95 moléculas de hapteno-1 habían sido conjugadas con una molécula de BSA.

Ejemplo 6: conjugación de hapteno-1 a BTG (Inmunógeno-II)

- 20 A una solución de sal de ácido 2-[4-(piperazin-1-il-metil)fenoxi] acético y TFA (**Hapteno-1**) (61,99 mg, 0,203 mmol) en DMF (1,0 ml) se añadió N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (46,01 mg, 0,223 mmol) y N-hidroxisuccinimida (25,66 mg, 0,223 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó mediante filtración la diciclohexilurea formada y se añadió la solución gota a gota a una solución de BTG (150 mg, 2,25 µmol) en solución 50 mM de bicarbonato de sodio (pH 8,5) (10 ml). Se agitó entonces la mezcla durante la noche a 4° C. Se realizó entonces diálisis a la solución contra solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) por 24 horas a 4° C, y se congeló.

Ejemplo 7: conjugación de hapteno-1 a HRP

- Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió de inmediato a una solución de sal de ácido 2-[4-(piperazin-1-il-metil)fenoxi] acético y TFA (**Hapteno-1**) (2 mg) en DMF (0,2 ml). Después de mezclar, se
30 añadió esta solución 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 la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el exceso de hapteno con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, llevadas a equilibrio previo con PBS a pH 7,2. El conjugado de hapteno-HRP fue sometido entonces a diálisis durante la noche contra 10 litros de PBS a pH 7,2 a 4° C.

Ejemplo 8: Preparación de ter-butil 4-(4-bencilpiperazin-1-il) propionato

- A una solución de 1-bencilpiperazina (8,813 g, 0,05 mol) en acetonitrilo (200 ml) bajo nitrógeno se añadió trietilamina (TEA) (16,7 ml, 0,12 mol) y ter-butil acrilato (15,4 g, 0,12 mol) y se agitó la mezcla a reflujo durante la noche. Se enfrió entonces la solución a temperatura ambiente y se concentró hasta sequedad. Se añadió entonces
40 etil acetato (300 ml) y se lavó la fase de etilacetato con agua (200 ml), salmuera (200 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta sequedad. El producto crudo obtenido fue purificado mediante cromatografía sobre gel de sílice usando 70% de etil acetato, 30% hexano para dar el ter-butil 4-(4-bencilpiperazin-1-il) propionato 5 como un aceite (12,6 g, 83%).

Ejemplo 9 de referencia: Preparación de sal de ácido 4-(4-bencilpiperazin-1-il) propiónico y TFA (Hapteno - 3)

- 45 A una solución de ter-butil 4-(4-bencilpiperazin-1-il) propionato 5 (12,2 g, 0,04 mol) en diclorometano (200 ml) se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (50 ml) y se agitó entonces la mezcla a temperatura ambiente por 6 horas. Se concentró la mezcla hasta sequedad y se trituró con éter el producto crudo obtenido y se filtró el sólido formado, se lavó con éter y se secó bajo vacío durante la noche para dar sal de ácido 4-(4-bencilpiperazin-1-il) propiónico y TFA (**Hapteno - 3**) (10,5, 72%). (Como se ilustra en la figura 4)

Ejemplo 10 de referencia: Conjugación de hapteno-3 a BSA (Inmunógeno-III)

A una solución de sal de ácido 4-(4-bencilpiperazin-1-il) propiónico y TFA (**Hapteno - 3**) (54,35 mg, 0,15 mM) en DMF (1,0 ml) se añadió N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (33,08 mg, 0,16 mM) y N-hidroxisuccinimida (18,7 mg, 0,16 mM) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró mediante filtración la diciclohexilurea formada y se añadió la solución gota a gota a una solución de BSA (150 mg, 2,3 µmol) en solución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Se agitó entonces la mezcla durante la noche a 4° C. Se sometió entonces la solución a diálisis contra solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) por 24 horas a 4° C, y se congeló.

Los resultados de MALDI mostraron que 6,03 moléculas de hapteno-3 se habían conjugado con una molécula de BSA.

10 **Ejemplo 11 de referencia: conjugación de hapteno-3 a BTG (Inmunógeno-IV)**

A una solución de sal de ácido 4-(4-bencilpiperazin-1-il) propiónico y TFA (**Hapteno - 3**) (73,55 mg, 0,203 mmol) en DMF (1,0 ml) se añadió N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (46,01 mg, 0,223 mmol) y N-hidroxisuccinimida (25,66 mg, 0,223 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró mediante filtración la diciclohexilurea formada y se añadió la solución gota a gota a una solución de BTG (150 mg, 2,25 µmol) en solución de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 8,5) (10 ml). Se agitó entonces la mezcla durante la noche a 4° C. Se sometió entonces a diálisis la solución contra solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7,2 (3 cambios) por 24 horas a 4° C, y se congeló.

Ejemplo 12 de referencia: conjugación de hapteno-3 a HRP

Se disolvió clorhidrato de EDC (10 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió de inmediato a una solución de sal de ácido 4-(4-bencilpiperazin-1-il) propiónico y TFA (**Hapteno-3**) (2 mg) en DMF (0,2 ml). Después de mezclar, se añadió esta solución 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 la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el exceso de hapteno con columnas PD-10 dobles (Pharmacia) en serie, llevadas a equilibrio previo con PBS a pH 7,2. Se sometió entonces a diálisis el conjugado de hapteno-HRP durante la noche contra 10 litros de PBS a pH 7,2 a 4° C.

25 **Ejemplo 13: desarrollo de un inmunoensayo de biochip**

Se recolectaron muestras de sangre de oveja Suffolk hembra 16 meses de edad, antes de la inmunización. Se preparó la mezcla de inmunización mediante adición de 2 mg de inmunógeno preparado en PBS a una relación de 50% de inmunógeno/PBS con 50% de adyuvante completo de Freund (Sigma, número de producto F5881) y producción de emulsión de la mezcla para preparar el producto final para la inmunización. El día 0, se inmunizó cada oveja por vía intramuscular con 1 ml de la mezcla descrita anteriormente, con ácido 2-[4-(piperazin-1-il-metil)fenoxi] acético conjugado con proteína portadora, tiroglobulina bovina (BTG) (como en el ejemplo 6 anteriormente). Se administraron impulsos subsiguientes (un total de 20 impulsos) por vía intramuscular, a cada oveja cada 30 días. Se usó el adyuvante completo de Freund (Sigma, número de producto F5881) para las inmunizaciones primarias y se usó el adyuvante incompleto de Freund (Sigma, número de producto F5506) para todas las inyecciones subsiguientes. Se tomaron sangrados de rutina entre los impulsos para hacer seguimiento al título y sensibilidad del anticuerpo, usando hapteno 1 conjugado a peroxidasa de rábano picante en un ELISA competitivo, probando reactividad cruzada a 1-bencilpiperazina y 4-OH bencilpiperazina.

Una vez se evaluó que el título del anticuerpo cumplía el criterio de desempeño requerido, es decir no había aumento significativo en el título del anticuerpo y se había alcanzado una meseta en el perfil de % de desplazamiento, se evaluaron los anticuerpos mediante inmunoensayo competitivo. Primero fueron inmovilizados sobre una plataforma de biochip (9 mm x 9 mm) (Randox Laboratories Ltd.), que era recipiente para las inmunorreacciones. Se usó el equipo de análisis semiautomático de mesa Evidence Investigator (EV3602, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido, documentos EP98307706, EP98307732, EP0902394, EP1227311, EP1434995 y EP1354623). El principio del ensayo se basó en la competencia por sitios de unión de los anticuerpos policlonales entre el antígeno libre (1-bencilpiperazina y otros reactivos cruzados) y el conjugado etiquetado (Hapteno 1-HRP, preparado como en el ejemplo 6). Al biochip apropiado se añadieron diluyente de ensayo (155 µl), agente de calibración/1-bencilpiperazina o reactivo cruzado potencial (25 µl) seguido del conjugado hapteno 1-HRP (120 µl). Se incubaron entonces los biochips por 30 minutos a 30°C sobre un termoagitador ajustado a 370 rpm. Se sometieron entonces los biochips a 2 ciclos de lavado rápido usando la solución amortiguadora de lavado suministrada, seguido por 4 ciclos de lavado x 2 minutos. Se añadieron entonces 250 µl de señal (1:1 luminol + peróxido, v/v) a cada biochip, y después de 2 minutos se tomó imagen del vehículo de biochip en el equipo de análisis Evidence Investigator. El sistema incorpora un software dedicado para procesar de manera automática, hacer el reporte y archivar los datos generados (pueden encontrarse detalles en FitzGerald, S. P. et al, Clin. Chem. 51(7); 1165-1176; 2005).

55 Resultados

Se generaron curvas de calibración usando el inmunoensayo a base de Biochip, como se describió anteriormente. Se calculó el IC₅₀ a partir de las gráficas, tomando 50% de la señal del agente de calibración cero y leyendo el valor correspondiente en el eje x, equivalente a la concentración de ligando no etiquetado que reduce la unión específica de ligando etiquetado en 50%. Se probó también la especificidad contra una variedad de analitos relacionados (Tabla 1). Se calculó la reactividad cruzada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%CR = IC_{50, 1\text{-bencilpiperazina}} / IC_{50, CR} \times 100$$

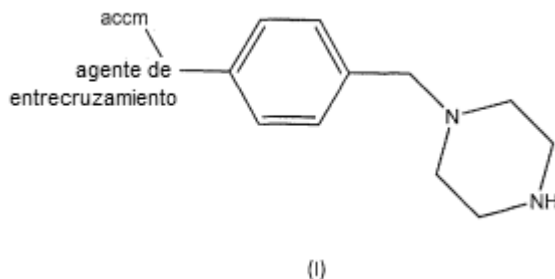
en la que %CR es el porcentaje de reactividad cruzada, IC₅₀, 1-bencilpiperazina es la concentración de 1-bencilpiperazina causa un desplazamiento de 50% de la señal e IC₅₀, CR es la concentración de 1-bencilpiperazina/ moléculas de metabolitos/estructuralmente relacionadas que causa un desplazamiento de 50% de la señal.

Tabla 1 Caracterización de anticuerpo usando antisuero aumentado a inmunógeno II y agente de detección derivado de Hapteno-1 en un formato de ensayo competitivo (CR basado en 100% de 1-bencilpiperazina)

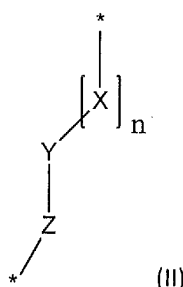
Analito	% de Reactividad cruzada	IC50
1-bencilpiperazina	100,0	1,4 ng/ml
4-OH bencilpiperazina	172,1	0,8
3-(piperazin-1ilmetil)fenol diHCl	123,7	1,1
1-piperonilpiperazina	101,5	1,4
N-(3-metilbencil)piperazina diHCl	52,9	2,6
1-(3-metilfenil)piperazina	3,9	35,9
1-fenilpiperazina	3,4	41,2
1-(2-metoxifenil)piperazina diHCl	3,2	43,8
1-(3-trifluorometilfenil)piperazina HCl	1,9	73,7
1-(4-metilfenil)piperazina	1,3	107,7
1-(3-hidroxifenil)piperazina	1,0	140
mCPP HCl	0,6	233,3

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno que tiene la estructura general (I):



en el que el agente de entrecruzamiento tiene la estructura general (II):



en la que, X, el cual está unido al anillo aromático, es bien sea un $-C(O)-$, O o NH; $n=0$ o 1, Y es un fragmento de alquileo C_1-C_{10} , preferiblemente un C_1-C_6 , de cadena recta, sustituido o no sustituido, o fragmento arileno, y Z (antes de la conjugación con el accm) es seleccionado de un fragmento carboxi, un ditiopiridilo, una maleimida, un amino, un hidroxilo, un tiol, un tioéster o un aldehído, y el accm es seleccionado del grupo de tiroglobulina bovina, albúmina de suero bovino, hemocianina de lapa, gamma globulina bovina y ovoalbúmina de huevo.

2. Un anticuerpo derivado de un inmunógeno de la reivindicación 1.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2 capaz de unirse a por lo menos un epítipo de un analito seleccionado de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3 que tiene un IC_{50} seleccionado de uno o más de aproximadamente 1 ng/ml para 1-bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 4-OH bencilpiperazina, aproximadamente 1 ng/ml para 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, aproximadamente 1 ng/ml para 1-piperonilpiperazina y aproximadamente 3 ng/ml para N-(3-metilbencil)piperazina.

5. Un procedimiento de detección o determinación de uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina; el procedimiento comprende el contacto de una muestra con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 2-4; detección o determinación de la cantidad del anticuerpo; y atribución de la presencia o cantidad del anticuerpo a la presencia o cantidad de uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina en la muestra.

6. Un ensayo para la detección o determinación de uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina; el ensayo comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 2-4; y medios para detectar o determinar la cantidad del anticuerpo para detectar o determinar la presencia o cantidad de uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina en la muestra.

7. Un kit para la detección o determinación de uno o más de 1-bencilpiperazina, 4-OH bencilpiperazina, 3-(piperazin-1ilmetil)fenol, 1-piperonilpiperazina y N-(3-metilbencil)piperazina; donde el kit comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 2-4.

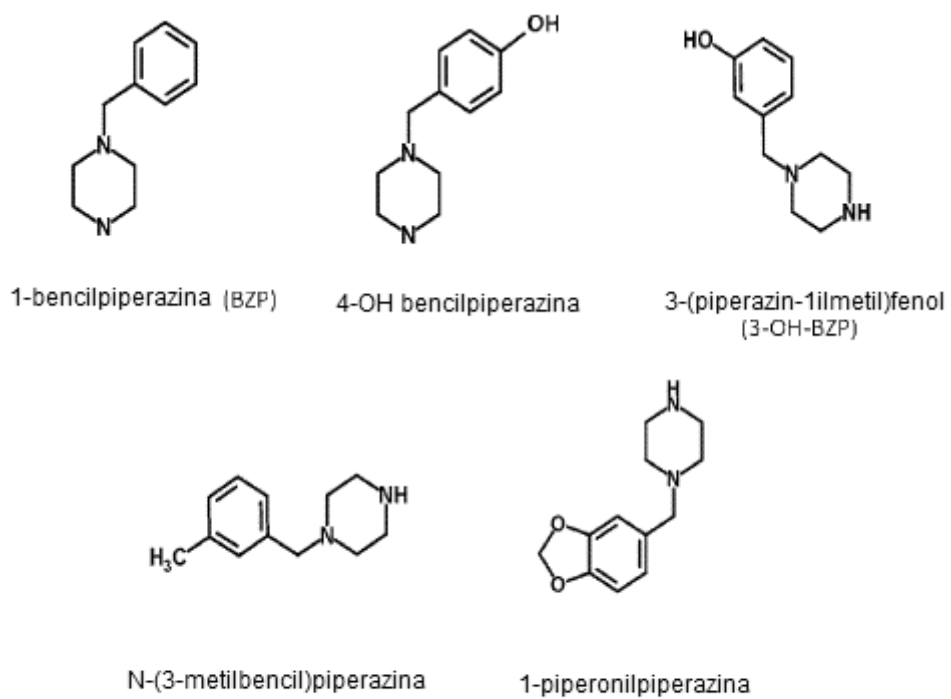


Figura-1

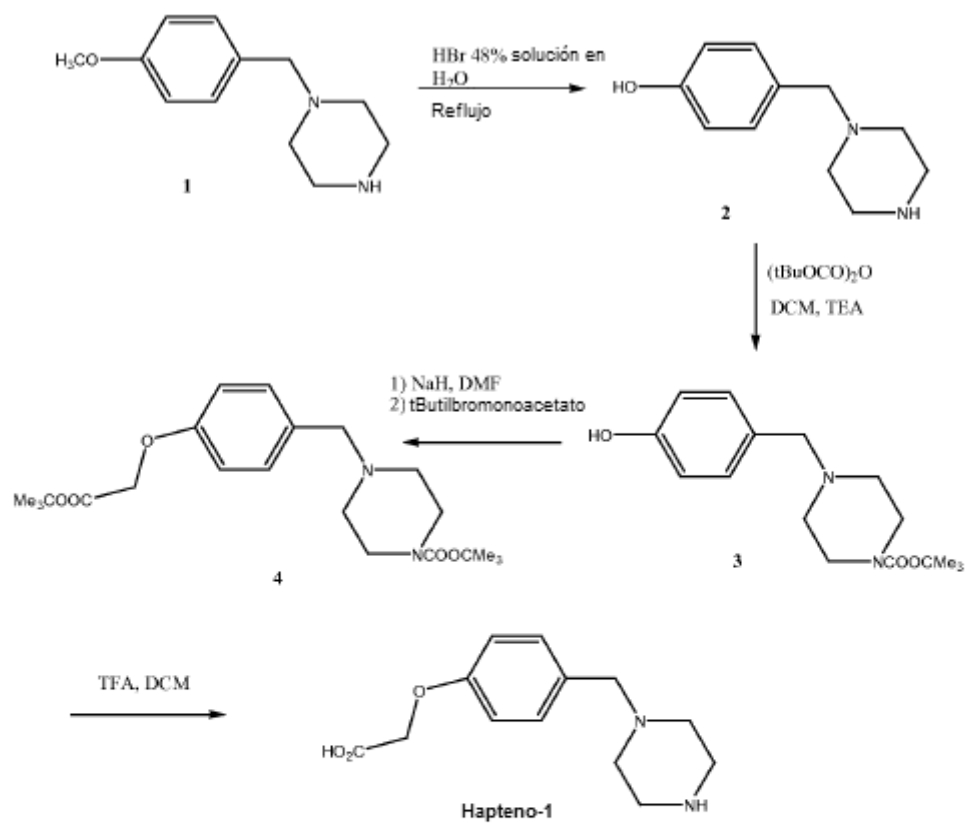


Figura-2

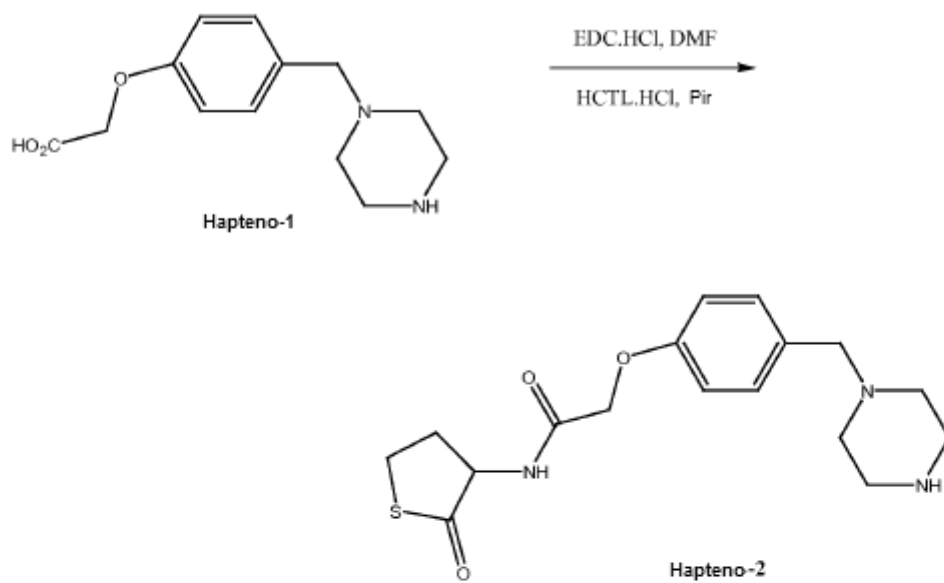


Figura-3

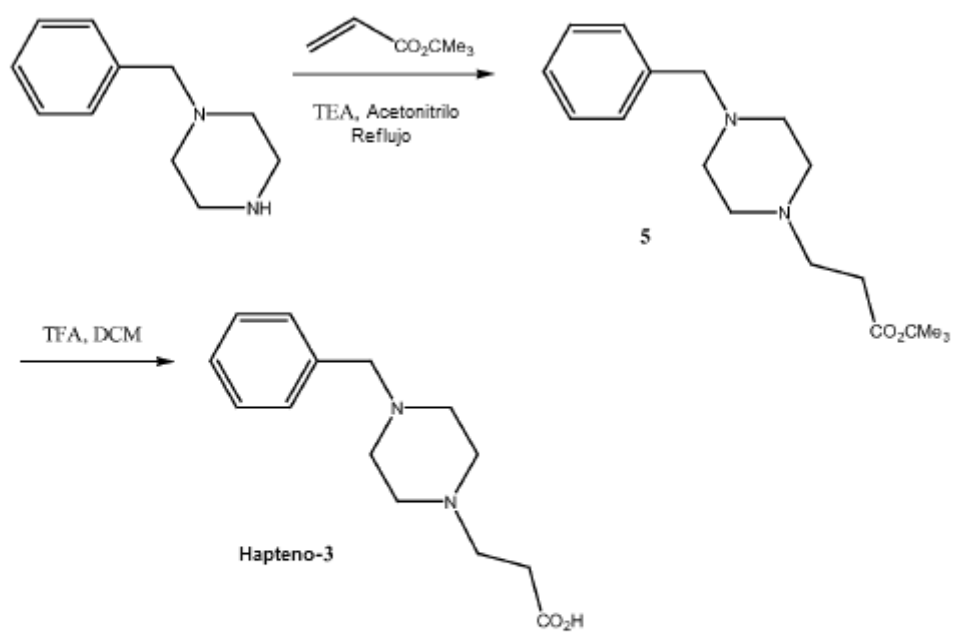


Figura-4