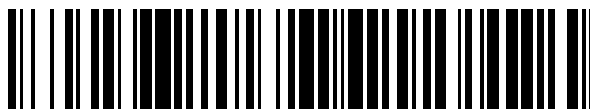


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 776**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2015** **E 15188130 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 3002592**

54 Título: **Inmunoensayo mejorado para pirrolidinofenonas**

30 Prioridad:

02.10.2014 GB 201417447

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

22.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 776 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo mejorado para pirrolidinofenonas

Antecedentes de la invención

Las catinonas sintéticas son una clase de drogas que han alcanzado popularidad a través de su uso como estimulantes sintéticos. Al igual que los cannabinoides sintéticos se han comercializado bajo la apariencia de 'incienso', las catinonas sintéticas se venden comúnmente como 'sales de baño' u ocasionalmente nutrientes para plantas, repelente de insectos, limpiador de estanques y ambientador al vacío todos los cuales se etiquetan frecuentemente como 'no para consumo humano'. Están disponibles en línea y de proveedores locales bajo una variedad de nombres incluyendo Ola de marfil, Nube nueve, Cara cortada, Cielo de vainilla, Relámpago banco, Tormenta de nieve, Leopardo de las nieves, Paloma roja, Huracán Charlie, Grava y Seda azul. Las catinonas sintéticas y sus derivados están relacionados con el alcaloide natural catinona que se encuentra en la planta Khat, *Catha edulis* y tiene propiedades moderadamente estimulantes.

Se usan para mimetizar los efectos de la cocaína y las anfetaminas y los efectos secundarios físicos de estas drogas incluyen taquicardia, hipertensión, arritmias y convulsiones. También están asociados con un rango de efectos comportamentales y del estado mental incluyendo ataques de pánico, ansiedad, paranoia, alucinaciones y comportamiento agresivo o violento. También se han ligado varias muertes al uso de 'sales de baño' (Marinetti y Antonides, 2013).

Desde su aparición como drogas recreacionales, los gobiernos de todo el mundo han tomado acciones para controlar estas sustancias. Por ejemplo, en 2010 el gobierno del Reino Unido ordenó una prohibición amplia de catinona sustituida en respuesta a informes crecientes del uso de mefedrona. El 21 de octubre de 2011, la Administración para el Control de Drogas en los Estados Unidos (DEA) finalizó la programación temporal de mefedrona, metilona y MDPV en la programación I bajo el Acta de Sustancias Controladas, en julio de 2012 esto se hizo permanente.

Después de la ilegalización de estos compuestos, surgió una segunda generación de catinonas sintéticas incluyendo alfa-pirrolidinopentiofenona (I-PVP). Entre abril y junio del 2013, la I-PVP fue la droga más prevalente en las muestras que dieron positivo en el Panel de Sales de Baño de los labs NMS (NMS labs, 2013). En algunos países, estas se encuentran bajo la legislación actual como análogos de compuestos prohibidos, pero en otros, tales como los EEUU, se tuvieron que implementar otras prohibiciones. El 28 de enero de 2014, la DEA listó temporalmente la I-PVP junto con otras 9 catinonas sintéticas como sustancias controladas bajo la Programación I; 4-metil-N-etilcatinona ("4-MEC"); 4-metil-alfapirrolidinopropiofenona ("4-MePPP"); 1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-(metilamino)butan-1-ona ("butilona"); 2-(metilamino)-1-fenilpentan-1-ona ("pentedrona"); 1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-(metilamino)pentan-1-ona ("pentilona"); 4-fluoro-N-metilcatinona ("4-FMC"); 3-fluoro-N-metilcatinona ("3-FMC"); 1-(naftalen-2-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentan-1-ona ("nafirona"); y alfa-pirrolidinobutiofenona ("α-PBP").

Un estudio sobre el metabolismo de I-PVP en ratas (Sauer *et al.*, 2009) sugirió las siguientes rutas; hidroxilación de la cadena lateral seguida de deshidrogenación a la cetona correspondiente; hidrogenación de la posición 2" del anillo pirrolidina seguida de deshidrogenación a la lactama correspondiente; degradación del anillo pirrolidina a la amina primaria correspondiente; hidroxilación del anillo fenilo, lo más probablemente en la posición 4'; apertura del anillo del anillo pirrolidina al ácido carboxílico correspondiente.

Los métodos analíticos actuales tienden a usar espectrometría de masa (MS) conjuntamente con cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) (Sauer *et al.*, 2009; Marinetti y Antonides, 2013). Una desventaja de dichos métodos de detección es que requieren un equipamiento costoso y personal altamente entrenado. Por otra parte, se sabe en la técnica que los inmunoensayos son alternativas relativamente rentables, simplistas y rápidas al análisis basado en MS. La patente europea número EP2626358 proporciona un inmunoensayo para detectar pirrolidinofenonas incluyendo MDPBP, nafirona, MPVP, MDPV y MDPPP con una reactividad cruzada muy baja frente a alfa-PVP. Los anticuerpos en EP2626358 se caracterizan por tener un valor Cl_{50} mayor de 20 ng/ml para cada una de las pirrolidinofenonas frente a las que se muestra reactividad cruzada. Permanece una necesidad de un inmunoensayo genérico mejorado que no sea solo más sensible para un rango de compuestos basados en pirrolidinofenona encontrados actualmente en drogas incautadas, sino que también pueda detectar análogos y derivados que puedan abrirse paso en el mercado en el futuro de manera que se permitan mejoras en los ensayos de toxicología forense y clínica de la ingesta de estas drogas de diseño en constante evolución.

Referencias

Sauer, C. *et al.* J. Mass. Spectrom. (2009); 44(6), 952-964.

Marinetti, L.J y Antonides, H.M. J.Anal. Toxicol. (2013); 37(3), 135-146.

Immunoassay: A practical guide, por Brian Law, Taylor y Francis Ltd, ISBN 0-203-48349-9.

FitzGerald, S. P. *et al.* Clin. Chem. (2005); 51(7), 1165-1176.

http://www.nmslabs.com/uploads/PDF/Bath_Salts_July_2013_PDF_letter.pdf

Dibujos

Figura 1 Reacciones químicas para la síntesis de ácido 2-[4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi]acético (PVP 4-CME) 5 (Hapteno-1).

5 **Figura 2** Reacciones químicas para la síntesis de PVP 4-CME-HCTL 6 (Hapteno-2)

Figura 3 Estructuras químicas de Hapteno-1 y Hapteno-2

Figura 4 Curva de calibración que muestra la absorbancia a 450nm usando I-PVP como el estándar en un ELISA que incorpora antisuero producido frente al inmunógeno II.

Resumen de la invención

10 En la presente memoria se describe un inmunoensayo mejorado para la detección y determinación de drogas de diseño basados en pirrolidinofenona en fluidos biológicos (orina, sangre, fluido oral y pelo). El inmunoensayo se sustenta en anticuerpos nuevos, específicos de subfamilia, que presentan una sensibilidad sorprendente. La invención describe además sustratos que comprenden un anticuerpo que es específico para compuestos de la familia de la pirrolidinofenona. También se describen los nuevos inmunógenos a partir de los que derivan los anticuerpos y kits que incorporan los anticuerpos de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

A no ser que se afirme otra cosa, los términos técnicos tal y como se usan en la presente memoria se usan según el uso convencional como conocen los expertos en la técnica.

20 Las estructuras químicas de los compuestos pirrolidinofenona referidos en la presente memoria se proporcionan en la tabla 3.

La invención describe un método para detectar o determinar compuestos pirrolidinofenona en una disolución o en una muestra *in vitro* de un individuo que comprende; poner en contacto la muestra con uno o más agentes de detección y uno o más anticuerpos; detectar, o determinar, la cantidad del uno o más agentes de detección; y deducir a partir de los calibradores, la presencia de o la cantidad de compuestos pirrolidinofenona en la muestra o disolución, caracterizándose el uno o más anticuerpos por haber derivado de un inmunógeno de estructura I.

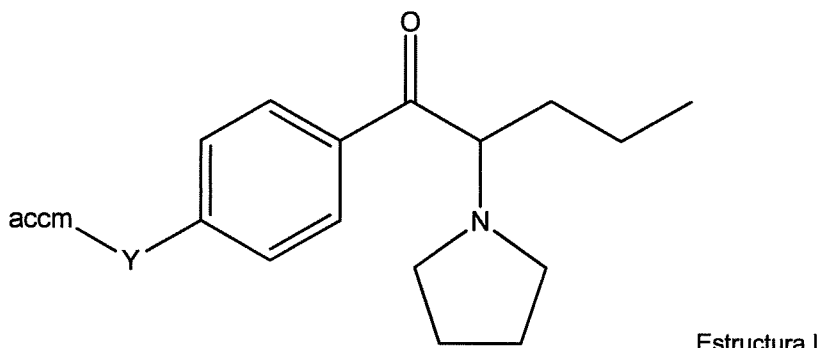
El término "hapteno", tal y como se usa en la presente memoria, describe una molécula preinmunogénica que estimula la producción de anticuerpos solo cuando se conjuga con una molécula transportadora mayor. Esta molécula transportadora mayor puede referirse como un material transportador que confiere antigenicidad (accm). Una vez el hapteno se ha conjugado con el accm forma el inmunógeno.

30 El término "inmunógeno", tal y como se usa en la presente memoria, describe una entidad que induce una respuesta inmune tal como la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal huésped.

El accm puede ser cualquier material que hace que todo o parte del hapteno sea susceptible al reconocimiento y unión por parte de anticuerpos. Por ejemplo, el accm puede ser una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético. Alternativamente, el accm comprende poli (aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina. Además, alternativamente, el accm se selecciona de materiales poliméricos sintéticos o naturales que portan grupos funcionales reactivos. Aún además, alternativamente, el accm se selecciona de carbohidratos, levaduras y polisacáridos. Los ejemplos ilustrativos de materiales transportadores que confieren antigenicidad útiles son albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo (OVA), gamma globulina bovina (BGG), tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa (KLH) etc. Opcionalmente, el accm se selecciona de KLH o BSA.

Se entenderá que los haptenos de la presente invención pueden unirse al material transportador que confiere antigenicidad (accm) a través de un grupo de entrecruzamiento o entrecruzador. El grupo de entrecruzamiento puede ser cualquier grupo de entrecruzamiento convencional usado de forma convencional en este campo. El grupo de entrecruzamiento es idealmente un grupo de unión funcionalizado que une el accm al hapteno. Preferiblemente, el grupo de entrecruzamiento puede comprender o consistir en un resto carboxilo, ditiopiridilo, maleimidilo, amino, hidroxilo, tiol y aldehído. El grupo de entrecruzamiento es muy conocido para el experto en la técnica de la síntesis de inmunógenos.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un inmunógeno que tiene la fórmula general:



En la que Y es un grupo de entrecruzamiento y accm es un material transportador que confiere antigenicidad.

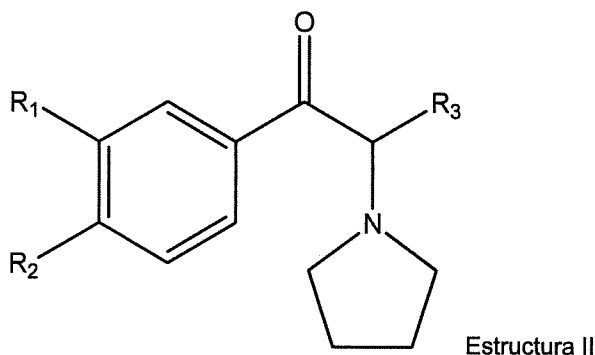
En la que Y es $-(A)_n-B-D$, en el que B es un resto alquileo C_{1-10} , preferiblemente C_{1-6} , sustituido o no sustituido, que incorpora opcionalmente un resto cicloalquilo y/o a heterocíclico; $n=0$ o 1 y A es un grupo funcional o heteroátomo que permite la unión del entrecruzador al anillo fenilo y D es un grupo funcional o heteroátomo que permite la unión del entrecruzador al material transportador que confiere antigenicidad. El término grupo funcional es una expresión estándar en el campo de la química y se refiere a un grupo reactivo tal como una amina, cetona, éter, tioéter, amida, alqueno, tiol, éster, ácido carboxílico o aldehído. Preferiblemente, A es O, S o N. Los sustituyentes de la cadena alquileo pueden incorporarse fuera, dentro o al final de la cadena. Habitualmente, los sustituyentes serán grupos funcionales situados al final de la cadena que han participado en la unión química con el fin de formar una unión entre la estructura de pirrolidinofenona y el material transportador. La conjugación del accm con Y puede facilitarse, por ejemplo, por la presencia de un ácido carboxílico o un éster de este, un aldehído, un grupo amino, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster de este, un resto ditiopiridilo, un resto vinilsulfona, un ácido tiocarboxílico o un éster de este.

Un ejemplo de un inmunógeno preferido de la presente invención es ácido 2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acético (hapteno 1) conjugado con una molécula transportadora que confiere antigenicidad seleccionada de KLH, BSA, BTG, BGG u OVA. La preparación de un inmunógeno preferido de la presente invención se muestra en los ejemplos 6 y 7. En estas reacciones, se usan N-Hidroxisuccinimida (NHS) más 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para facilitar el entrecruzamiento del grupo carboxilo en el hapteno I con un grupo amida en el accm.

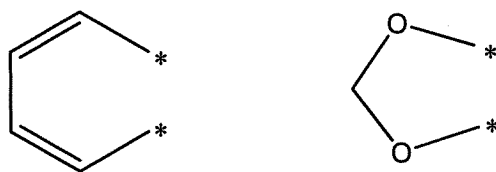
Un aspecto adicional de la presente invención es un anticuerpo producido frente a un inmunógeno descrito anteriormente. El término "anticuerpo", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una inmunoglobulina o molécula semejante a inmunoglobulina. En una realización preferida, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. Sin embargo, el experto en la técnica entenderá que puede usarse cualquier tipo de molécula de inmunoglobulina o fragmento de esta, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab, fragmentos scFv y cualesquiera otros fragmentos de unión a antígeno, todos los cuales están en el alcance de la presente invención. Los anticuerpos policlonales pueden producirse por cualquier método como conocen los expertos en la técnica. Puede usarse cualquier animal huésped adecuado en el proceso de inmunización, preferiblemente un animal mamífero, por ejemplo, pero no limitado a, oveja, conejo, ratón, cobaya o caballo. Además, los anticuerpos pueden estar en la forma de antiseros policlonales.

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 por el anticuerpo, como se evalúa por una medida adecuada tal como la reactividad cruzada. Para propósitos de comparación, a un analito con alta reactividad cruzada se le proporciona generalmente un valor de 100%, teniendo todos los demás analitos un valor relativo a este; además, como conoce un experto en la técnica, para que la reactividad cruzada tenga un uso práctico, el anticuerpo específico del analito debe presentar una alta sensibilidad según se mide por una medida adecuada tal como la Cl_{50} . La Cl_{50} es un indicador usado comúnmente de la sensibilidad de los anticuerpos para inmunoensayos. Para permitir que un ensayo se aplique eficazmente en el campo, se prefiere una Cl_{50} de menos de o aproximadamente 20 ng/ml, preferiblemente menos de o aproximadamente 10 ng/ml, más preferiblemente menos de o aproximadamente 5 ng/ml y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 1 ng/ml para cualquier analito individual. Dadas las Cl_{50} de varios analitos, pueden calcularse sus reactividades cruzadas, representadas frecuentemente como porcentajes relativos.

El anticuerpo producido frente a un inmunógeno de la presente invención es capaz de unirse a un epítipo de la estructura II:



En la que R₃ es alquilo C₂-C₆, R₁ y R₂ son H, alquilo C₁ - C₄, alcoxi C₁ - C₄, alquilo C₁ - C₄ sustituido con hidroxilo, carboxi o hidroxilo, o conjuntamente forman



o

sustituido o no sustituido.

En una realización preferida, R₃ de la estructura II es un alquilo C₂-C₃.

Preferiblemente, el anticuerpo de la invención es capaz de unirse al menos a un epítipo del grupo que comprende las moléculas alfa-PVP, pirovalerona, MDPV, MDPBP, Nafirona, y 4-Metoxi-alfa-pirrolidinopentiofenona (MOPVP). El término 'capaz de unirse a' o "capaz de unirse", tal y como se usa en la presente memoria, significa que, bajo condiciones estándar de inmunoensayo, por ejemplo, como se describe en 'Immunoassay: A practical guide' por Brian Law, Taylor y Francis Ltd (ISBN 0-203-48349-9), los anticuerpos se unirán a dichas moléculas. Debido a las fuerzas intermoleculares atrayentes tales como enlace de hidrógeno y fuerzas de van der Waal, existe frecuentemente un grado de unión o afinidad entre dos moléculas independientemente de sus estructuras respectivas; el experto en la técnica reconoce que la ausencia de reactividad cruzada o una reactividad cruzada mínima implica que, en el contexto de un inmunoensayo de trabajo, cualquier unión o interacción entre un anticuerpo y los analitos no diana se produce a un nivel tan bajo que no compromete la integridad del inmunoensayo, es decir, se evitan los falsos positivos.

Opcionalmente, el anticuerpo tiene un 100% de reactividad cruzada frente a alfa-PVP y mayor del 100% de reactividad cruzada frente a pirovalerona, MDPV, nafirona y MOPVP, con menos del 100% de reactividad cruzada frente a MDPBP. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo de la presente invención puede caracterizarse por su alta sensibilidad. Preferiblemente, tiene una Cl₅₀ de menos de aproximadamente 5 ng/ml, más preferiblemente menos de aproximadamente 1 ng/ml e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 0,5 ng/ml para cada uno de alfa-PVP, pirovalerona, MDPV, MDPBP, Nafirona y MOPVP.

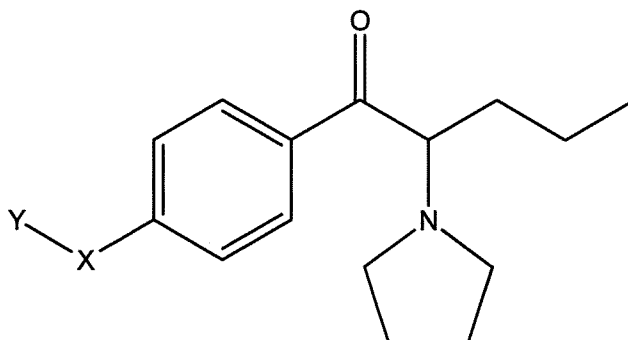
El uso de la palabra 'aproximadamente' tiene en cuenta las variaciones menores esperadas en el valor medido de Cl₅₀ que pueden surgir durante los análisis científicos por diferentes individuos cuando efectúan el ensayo o de ligeras diferencias en el equipo y reactivos del ensayo.

Un aspecto adicional de la invención es un método de inmunoensayo para detectar o determinar compuestos pirrolidinofenona o derivados de estos en una muestra *in vitro* de un individuo o en una disolución derivada de una sustancia que se sospecha que contiene dichos compuestos, 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 o los agentes de detección; y deducir de una curva de calibración la presencia de, o cantidad de compuestos pirrolidinofenona en la muestra o disolución. Los compuestos pirrolidinofenona que se van a detectar o determinar son uno o más del grupo que comprende alfa-PVP, pirovalerona, MDPV, MDPBP, Nafirona y MOPVP.

Para los propósitos de la invención, la muestra que se va a usar para el análisis *in vitro* puede ser cualquier muestra a partir de la que puede detectarse un compuesto pirrolidinofenona, por ejemplo, pelo o un fluido biológico periférico, pero es preferiblemente sangre completa, suero, plasma, pelo u orina. La muestra también puede ser una disolución que se sospecha que contiene una droga.

'Detectar', tal y como se refiere en la presente memoria, significa analizar cualitativamente la presencia o ausencia de una sustancia, mientras 'determinar' significa analizar cuantitativamente la cantidad de una sustancia. El agente de detección es una molécula pequeña (generalmente con una estructura similar a una molécula que se va a detectar), conjugada con un agente de marcaje que es capaz de unirse a uno de los anticuerpos de la invención. Los nombres alternativos para el agente de detección son el conjugado o trazador. El agente de marcaje se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radiactiva, o una mezcla de estas. Preferiblemente, el agente de marcaje es una enzima, preferiblemente, una peroxidasa, lo más preferiblemente peroxidasa de rábano (HRP). Alternativamente, o adicionalmente, la sustancia luminiscente puede ser un material bioluminiscente, quimioluminiscente o fluorescente. Preferiblemente, para el método de inmunoensayo de la invención, el agente de detección se basa en un compuesto con una subestructura de catinona sustituida conjugada con una enzima o molécula fluorescente.

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



Estructura III

En la que X es un grupo de entrecruzamiento e Y es un agente de marcaje que es detectable.

En la que X es $-(A)_n-B-D$, en el que B es un resto alquileo C_{1-10} , preferiblemente C_{1-6} , sustituido o no sustituido, que incorpora opcionalmente un resto cicloalquilo y/o heterocíclico; $n=0$ o 1 y A es un grupo funcional o heteroátomo que permite la unión del entrecruzador al anillo fenilo y D es un grupo funcional o heteroátomo que permite la unión del entrecruzador al agente de marcaje. El término grupo funcional es una expresión estándar en el campo de la química y se refiere a un grupo reactivo tal como una amina, cetona, éter, tioéter, amida, alqueno, tiol, éster, ácido carboxílico o aldehído. Preferiblemente, A es O, S o N. Los sustituyentes de la cadena alquileo pueden incorporarse fuera, dentro o al final de la cadena. Habitualmente, los sustituyentes serán grupos funcionales situados al final de la cadena que han participado en la unión química con el fin de formar una unión entre la estructura de pirrolidinofenona y el agente de marcaje. La conjugación del agente de marcaje con X puede facilitarse, por ejemplo, por la presencia de un ácido carboxílico o un éster de este, un aldehído, un grupo amino, una maleimida, un ácido halocarboxílico o un éster de este, un resto ditiopiridilo, un resto vinilsulfona, un ácido tiocarboxílico o un éster de este.

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 estas.

Un ejemplo de un conjugado o agente de detección preferido de la presente invención es ácido 2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acético (hapteno I) acoplado a HRP. La preparación de este conjugado se muestra en el ejemplo 8.

La invención describe además un sustrato con el que se unen los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos pueden unirse con el sustrato, por ejemplo, por adsorción pasiva o pueden unirse químicamente al sustrato unido, por ejemplo, mediante enlaces covalentes. Dicha unión covalente requiere generalmente la introducción inicial de un compuesto químicamente activo unido covalentemente a la superficie del sustrato antes de la unión del anticuerpo. El anticuerpo en sí mismo también puede requerir la adición de un grupo químico activador para conseguir la unión del sustrato. Estos requerimientos son muy conocidos en la técnica. El sustrato puede ser cualquier medio capaz de adsorber o unirse a un anticuerpo, por ejemplo, un lecho o nanopartícula (opcionalmente, activados químicamente), pero tiene preferiblemente una conformación plana (opcionalmente, activada químicamente) tal como una placa de microtitulación (como en el Ejemplo 9 más adelante) o un biochip. Las placas de microtitulación consisten comúnmente en 6, 24, 96, 384 o 1.536 pocillos de muestra dispuestos en una matriz rectangular 2:3. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se usan comúnmente en un ELISA. Un biochip es un sustrato fino semejante a una oblea con una superficie plana que puede fabricarse de cualquier material adecuado tal como vidrio o plástico, pero que se fabrica preferiblemente de cerámica. El biochip es capaz de ser activado químicamente antes de la unión del anticuerpo o es susceptible a la adsorción pasiva de anticuerpos. El experto en la técnica de desarrollo de biochips para aplicación en inmunoensayos reconocerá que una superficie plana a alta resolución, p. ej., si se usa un

microscopio electrónico de barrido (SEM), no es perfectamente 'plana' sino que poseerá una superficie desigual, siendo el aspecto importante que la superficie 'aproximadamente' plana sea adecuada para la aplicación. Puede añadirse opcionalmente un recubrimiento en microcapa de material a la superficie plana del sustrato antes de la inmovilización del anticuerpo. Pueden recubrirse bien la superficie superior o ambas superficies del sustrato.

5 Metodología general

Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

Aunque los haptenos proporcionan epítomos estructurales definidos, no son en sí mismos inmunogénicos y, por lo tanto, es necesario conjugarlos con materiales transportadores, que incitarán una respuesta inmunogénica cuando se administran a un animal huésped. Los materiales transportadores apropiados contienen comúnmente segmentos de poli(aminoácidos) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteínas. Los ejemplos ilustrativos de materiales transportadores útiles son albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo (OVA), gamma globulina bovina (BGG), tiroglobulina bovina (BTG), hemocianina de lapa (KLH) etc. Alternativamente, pueden emplearse poli(aminoácidos) sintéticos que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, así como otros materiales poliméricos sintéticos o naturales que portan grupos funcionales reactivos. También pueden conjugarse carbohidratos, levaduras o polisacáridos al 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 tiene propiedades fluorescentes o un marcaje radiactivo para la preparación de agentes de detección para uso en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado de esta. La formación del inmunógeno para la invención descrita en la presente memoria implica química de conjugación convencional. Con el fin de confirmar que se ha logrado la conjugación adecuada del hapteno al material transportador, antes de la inmunización, cada inmunógeno se evalúa usando espectroscopía de masa de tiempo de vuelo con desorción/ionización mediante láser UV asistida por matriz (MALDI-TOFMS).

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

La espectrometría de masa MALDI-TOF puede realizarse usando un espectrómetro de masa con desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Una alícuota de cada muestra que se va a analizar puede diluirse en ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0,1 % para crear diluciones de muestra de 1 mg/ml. Las alícuotas (1 µl) pueden analizarse usando una matriz de ácido sinapínico y albúmina de suero bovino (Fluka) como un calibrador externo.

Preparación de antisueros

Con el fin de general antisueros policlonales, se preparan 2 mg de un inmunógeno de la presente invención en PBS, mezclado a una relación de 50 % de inmunógeno en PBS con 50 % de adyuvante Completo de Freund (Sigma, Número de Producto— F5881) y se emulsiona pasando repetidamente la mezcla a través de una punta al final de una jeringa de 1 ml, hasta que alcanza la consistencia semisólida requerida. Se inyecta entonces 1 ml de la mezcla en un animal huésped, tal como conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. Las ovejas son el animal huésped preferido. Se administran inyecciones adicionales (refuerzos) mensualmente (se prepara 1 mg de inmunógeno en PBS y se mezcla a una relación de 50 % de inmunógeno en PBS con 50 % de Adyuvante Incompleto de Freund, Sigma Número de producto— F5506) hasta que se consigue la titulación requerida. El suero se muestrea para la evaluación de la titulación de anticuerpo.

Brevemente, se recoge sangre mediante la aplicación de presión en la vena yugular expuesta y la inserción de una aguja hipodérmica limpia de calibre 14 para extraer 500 µl de sangre por oveja, bajo gravedad. La sangre se almacena a 37 °C durante un mínimo de 1 hora antes de que los coágulos se separen del lateral de las botellas de la centrifuga usando pipetas de 1 ml desechables (golpeando ligeramente). Las muestras se almacenan a 4 °C toda la noche.

Las muestras se centrifugan entonces a 4.200 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El suero se retira por vertido y se centrifuga de nuevo, a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, antes de alícuotarlo y almacenarlo a <-20 °C. La fracción de inmunoglobulina (Ig) se extrae de los anticuerpos mediante precipitación de la inmunoglobulina con ácido caprílico/sulfato de amonio.

La titulación del anticuerpo se evalúa recubriendo una placa de microtitulación (Thermo Fisher Scientific NUNC, 468667) con anticuerpo (125 µl/pocillo) en tampón de recubrimiento (Tris 10 mM pH 8,5) a 37 °C durante 2 horas. La placa se lava entonces 4 veces durante 10 minutos con TBST a concentración de trabajo. Se añaden 50 µl de muestra/estándar (I-PVP) a los pocillos apropiados en triplicado, seguido de 75 µl de conjugado hapteno-HRP y se incuba a 25 °C durante 1 hora. La placa se lava entonces y se añaden 125 µl de TMB (Randox Laboratories, 4380-15) a cada pocillo y se deja a temperatura ambiente durante 20 mins en oscuridad. La reacción se para usando 125 µl de ácido sulfúrico 0,2 M. Las absorbancias se leen a 450 nm con un lector de microplacas de ELISA (BIO-TEK Instruments, Elx800) y se calculan las medias. Entonces puede determinarse la sensibilidad del anticuerpo.

Cuando se ha conseguido la titulación óptima, el animal huésped se sangra para rendir un volumen adecuado de anticuerpo específico (globalmente, esto resulta en 20 sangrados en total, con aproximadamente 200 ml de antisero conseguidos por sangrado). El grado de la purificación del anticuerpo requerido depende de la aplicación pretendida. Para muchos propósitos, no hay un requerimiento para la purificación, sin embargo, en otros casos, tales como cuando el anticuerpo se va a inmovilizar en un soporte sólido, pueden realizarse etapas de purificación para eliminar el material no deseado y para eliminar la unión no específica.

Están disponibles varias etapas de purificación, si se requiere, incluyendo precipitación de inmunoglobulinas (como se ha descrito anteriormente), purificación por afinidad específica de antígeno, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico.

Desarrollo del inmunoensayo

El proceso para desarrollar un inmunoensayo es muy conocido para el experto en la técnica. Brevemente, para un inmunoensayo competitivo en el que el analito diana es una molécula no inmunogénica, tal como un hapteno, se lleva a cabo el siguiente proceso: se producen anticuerpos mediante la inmunización de un animal, preferiblemente un animal mamífero, por la administración repetida de un inmunógeno. El suero del animal inmunizado se recoge cuando la titulación del anticuerpo es lo suficientemente alta. 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 para la unión a los anticuerpos. El proceso puede comprender fijar dichos anticuerpos séricos a un sustrato de apoyo 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 como se ha descrito anteriormente para medir la titulación de los anticuerpos o como un formato basado en Biochip. Los 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 lo que a su vez es inversamente proporcional a la concentración del analito. La señal puede detectarse o cuantificarse por comparación con un calibrador.

Ejemplos

Los números en **(negrita)** se refieren a las estructuras en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 1: Síntesis de 2-bromo-1-(4-hidroxifenil) pentan-1-ona (2)

Una disolución de 4-hidroxi valerofenona (**1**) (15 g, 0,084 moles) en ácido acético (100 ml) se añadió gota a gota a una disolución de bromo (4,5 ml, 0,088 moles) en ácido acético (120 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron en vacío y el residuo resultante se disolvió en agua y acetato de etilo. La capa orgánica se separó, se lavó con tiosulfato de sodio, agua y salmuera. La fase orgánica se secó entonces sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad para proporcionar 2-bromo-1-(4-hidroxifenil)pentan-1-ona (**2**) (25,59 g) como un aceite amarillo.

Ejemplo 2: Síntesis de 1-(4-hidroxifenil)-2-(pirrolidin-1-il) pentan-1-ona.HCl (4-Hidroxi-PVP HCl) (3)

Se añadió pirrolidina (14 ml, 0,168 moles) lentamente a una disolución de 2-bromo-1-(4-hidroxifenil) pentan-1-ona (**2**) (25,59 g, 0,084 moles) seguido de la adición de carbonato de potasio (23,22 g, 0,168 moles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 50-100 % acetato de etilo en éter de petróleo) para proporcionar la base libre de 1-(4-hidroxifenil)-2-(pirrolidin-1-il) pentan-1-ona (4-OH-PVP) (14,18 g) como un aceite. El aceite resultante se disolvió en 100 ml de metanol y se añadió lentamente una disolución de HCl 2M en éter. Un precipitado formado se recogió por filtración, se lavó con éter y se secó en vacío para proporcionar 1-(4-hidroxifenil)-2-(pirrolidin-1-il) pentan-1-ona.HCl (**3**) (11,44 g) como un sólido blanco.

Ejemplo 3: Síntesis de 2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acetato de terc-butilo (4)

Se añadió carbonato de potasio (2,511 g, 0,0182 moles) a una suspensión de 1-(4-hidroxifenil)-2-(pirrolidin-1-il)pentan-1-ona.HCl (**3**) (1,5 g, 5,28 mmoles) en tetrahidrofurano (40 ml). A la suspensión resultante se añadió dimetilformamida (10ml) y la mezcla se agitó y se calentó a 60 °C durante 30 min. Se añadió bromoacetato de terc-butilo (2,686 ml, 0,0182 moles) y la mezcla de reacción se agitó a 60-70 °C durante 2 horas. El disolvente se eliminó en vacío y el residuo se disolvió en agua y acetato de etilo. La capa orgánica se separó, se lavó con agua, salmuera, después se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad. El aceite resultante se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 10 % metanol en diclorometano) para proporcionar 2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil) fenoxi) acetato de terc-butilo (**4**) (1.37 g) como un aceite amarillo.

Ejemplo 4: Síntesis de ácido 2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acético (PVP 4-CME) (5) (Hapteno-1)

Se añadió ácido trifluoroacético (10 ml) a una disolución de 2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acetato de terc-butilo (**4**) (1,37 g, 3,79 mmoles) en diclorometano (20 ml) a 0 °C. La disolución se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. El disolvente se eliminó en vacío para proporcionar un sólido espumoso marrón claro. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 10% MeOH en acetato de etilo) para proporcionar ácido 2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acético (PVP 4-CME) (**5**) (**Hapteno-1**) (596 mg) como un aceite espumoso.

RMN 13C (CD3OD): 194,27, 170,67, 164,10, 161,6, 131,53 (2), 127,97, 155,36 (2), 69,98, 64,82, 55,21, 52,35, 32,88, 23,02, 17,48, 13,23.

Ejemplo 5: Síntesis de N-(2-oxotetrahidrotiofen-3-il)-2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acetamida (PVP 4-CME HCTL) (Hapteno-2) (6)

Se añadieron hidrocloreto de D,L-homocisteína tiolactona (60,43 mg, 0,39 mmoles) y EDC.HCl (75,41 mg, 0,39 mmoles) a una disolución de ácido 2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acético (PVP 4-CME) (**5**) (109 mg, 0,35 mmoles) en piridina (10 ml) a temperatura ambiente. La disolución se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El disolvente se eliminó en vacío y el residuo se disolvió en agua y diclorometano. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 10 % MeOH en cloroformo) para proporcionar N-(2-oxotetrahidrotiofen-3-il)-2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)pentanoil)fenoxi)acetamida (PVP 4-CME HCTL) (**6**) (**Hapteno-2**) (100 mg) como un aceite espumoso.

Ejemplo 6: Conjugación de PVP 4-CME (5) (Hapteno-1) con BSA (Inmunógeno-1)

A una disolución de PVP 4-CME (**5**) (**Hapteno-1**) (23,5 mg) en DMF (1,0 ml) se añadió hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida EDC.HCl (73,7 mg) y N-hidroxisuccinimida (44,3 mg) y la mezcla se incubó en el agitador rotativo a temperatura ambiente toda la noche. Esta disolución se añadió gota a gota a una disolución de BSA (100 mg, 1,5 mmoles) en disolución salina tamponada con fosfato (50 mM) (pH 8,0) (10 ml). La disolución resultante se incubó en el agitador rotativo a temperatura ambiente toda la noche. El hapteno en exceso se eliminó por diálisis frente a disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C y se liofilizó.

Los resultados de MALDI mostraron que 19,8 moléculas de PVP 4-CME (Hapteno-1) se habían conjugado con una molécula de BSA.

Ejemplo 7: Conjugación de PVP 4-CME (5) (Hapteno-1) con KLH (Inmunógeno-2)

A una disolución de PVP 4-CME (**5**) (**Hapteno-1**) (27,7 mg) en DMF (1,0 ml) se añadió hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl) (73,7 mg) y N-hidroxisuccinimida (44,3 mg) y la mezcla se incubó en el agitador rotativo a temperatura ambiente toda la noche. Esta disolución se añadió gota a gota a una disolución de KLH (100 mg) en disolución salina tamponada con fosfato (50 mM) (pH 8,0) (10 ml). La disolución resultante se incubó en el agitador rotativo a temperatura ambiente toda la noche. El hapteno en exceso se eliminó por diálisis frente a disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 (3 cambios) durante 24 horas a 4 °C y se liofilizó.

Ejemplo 8: Conjugación de PVP 4-CME (Hapteno-1) (5) con HRP

Se disolvió hidrocloreto de EDC (1,5 mg) en agua (0,5 ml) y se añadió inmediatamente a una disolución de PVP 4-CME (**5**) (**Hapteno-1**) (3 mg) en DMF (0,2 ml). Después de mezclar, esta disolución se añadió gota a gota a una disolución de HRP (20 mg) en agua (1 ml). Se añadió N-hidroxisuccinimida (1 mg) y la mezcla de reacción se incubó en oscuridad a temperatura ambiente toda la noche. El hapteno en exceso se eliminó con doubles columnas PD-10 (Pharmacia) en serie, preequilibradas con PBS a pH 7,2. El conjugado hapteno-1-HRP (trazador-1) se dializó entonces toda la noche frente a 10L de PBS a pH 7,2 a 4 °C.

Ejemplo 9: Desarrollo de un inmunoensayo para compuestos basados en pirrolidinofenona

Se extrajo IgG de los antisueros usando precipitación con sulfato de amonio/ácido caprílico y el anticuerpo purificado se inmovilizó en una placa de ELISA de 96 pocillos a 2,5 µg/ml en tampón TRIS 10 mM, pH 8,5 toda la noche a 4 °C. El ensayo se basa en la competición para los sitios de unión de un anticuerpo policlonal entre el trazador HRP e I-PVP o reactantes cruzados potenciales. La placa se lavó (x3) con TBST y se añadieron el calibrador (I-PVP) o reactantes cruzados potenciales (50 µl por pocillo), seguido de trazador HRP (75 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Las placas se incubaron entonces durante 60 minutos a 25 °C. Se sometieron entonces a 2 ciclos de lavado rápido usando TBST, seguido de 4 ciclos de lavado de 2 minutos. Se añadieron entonces 125 µL de señal 25 (TMB) a cada pocillo durante 20 mins a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se paró por la adición de 125 µl de ácido sulfúrico 0,2 M por pocillo y las placas se leyeron inmediatamente a 450 nm. Se generaron curvas de calibración y estas se usaron para determinar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo para I-PVP y reactantes cruzados potenciales. Los datos se introdujeron en un programa informático denominado 'KC Junior' (Biotek). Proporciona una curva de ajuste de 4 parámetros y permite el cálculo de concentraciones entre las operaciones estándar. Este

programa se usa para calcular los valores de CI_{50} dividiendo el valor de la densidad óptica (DO) de 0 ng/ml por 2 y obteniendo el valor de la concentración de la curva para esta DO. Los resultados de este estudio se presentan en las tablas 1 y 2, calculándose la reactividad cruzada según la siguiente fórmula:

$$\% CR = CI_{50} \text{ I-PVP} / CI_{50} \text{ CR} \times 100$$

- 5 En la que % CR es el porcentaje de reactividad cruzada, CI_{50} I-PVP es la concentración de I-PVP que causa un 50 % de desplazamiento de la señal y CI_{50} CR es la concentración de reactante cruzado potencial que causa un 50 % de desplazamiento de la señal.

10 El anticuerpo (RS2922) usado para generar los datos de las tablas siguientes se produjo a partir del inmunógeno II (Ejemplo 7) y el trazador HRP se preparó como en el Ejemplo 8. Todos los compuestos de la tabla 2 están disponibles comercialmente de proveedores tales como Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, EEUU).

Tabla 1 Resultados de ELISA para el anticuerpo RS2922 recubierto a 2,5 µg/ml con trazador marcado HRP a una dilución de 1/128k.

Estándar (ng/ml)	DO Promedio	% CV	B/B ₀
0,000	1,583	0,7	100
0,156	1,109	1,4	70
0,313	0,805	0,8	51
0,625	0,521	1,6	33
1,250	0,339	0,8	21
2,500	0,221	0,0	14
5,000	0,130	0,0	8
10,000	0,077	0,9	5
CI_{50}	0,315		

B = absorbancia a 450nm a x ng/ml de concentración de estándar

- 15 B₀ = absorbancia a 450nm a 0 ng/ml de concentración de estándar

CI_{50} = concentración de estándar que produce un 50 % de B/B₀

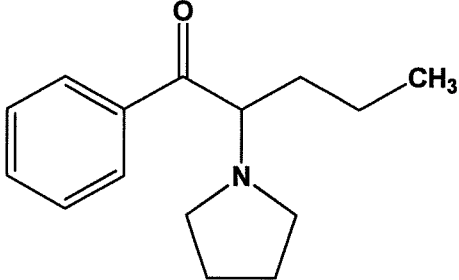
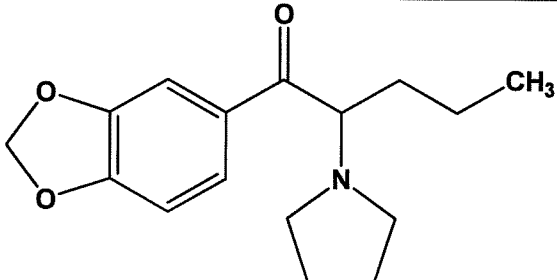
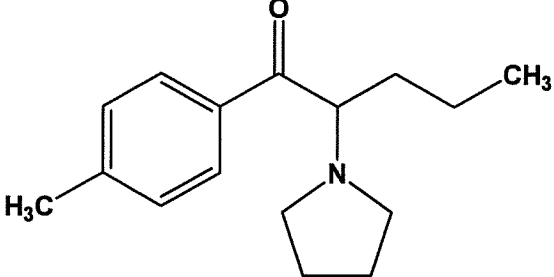
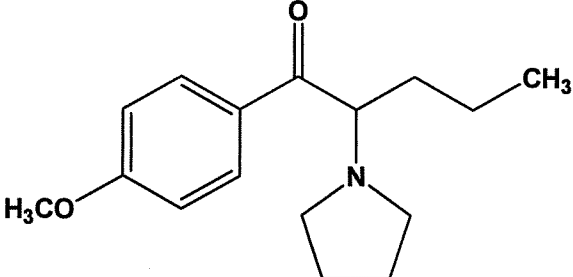
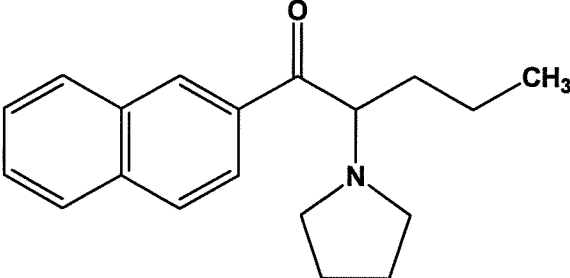
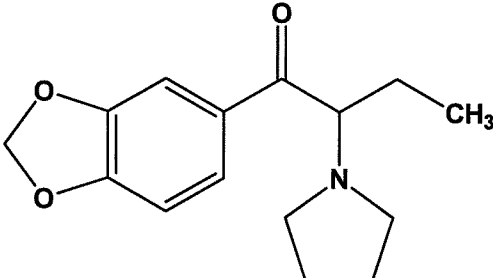
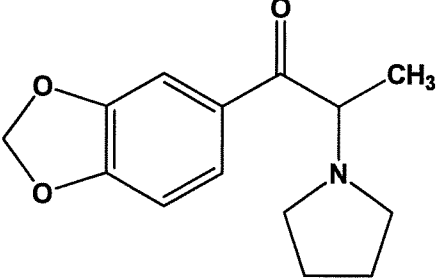
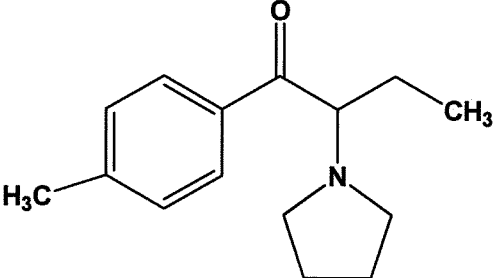
DO= Densidad óptica

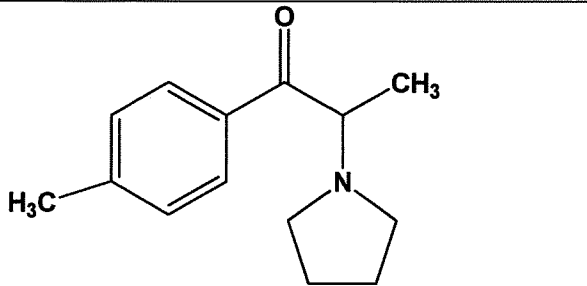
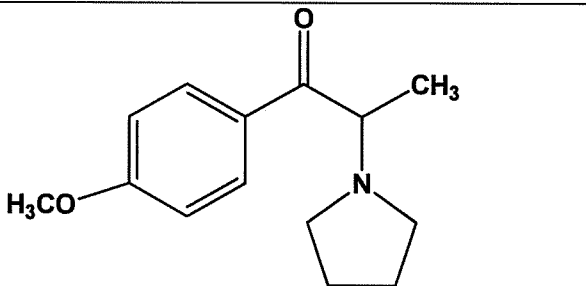
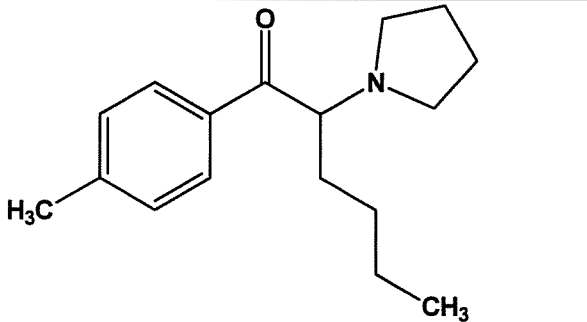
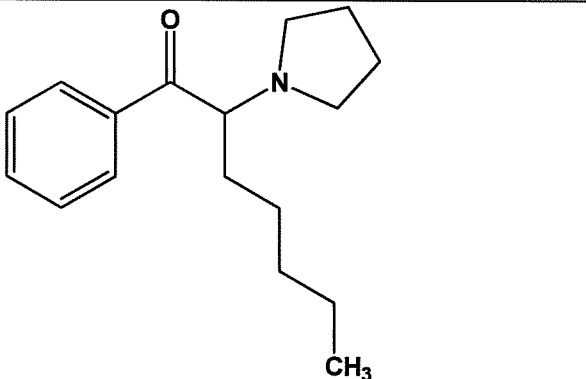
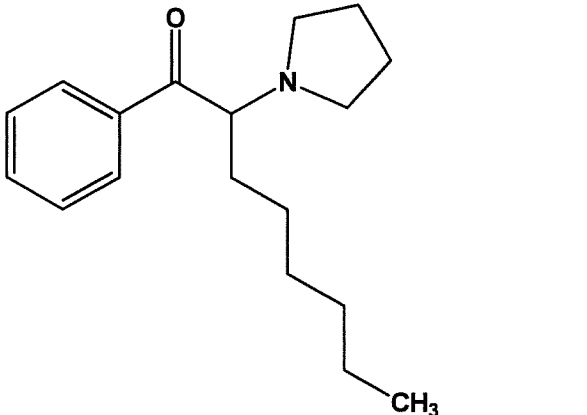
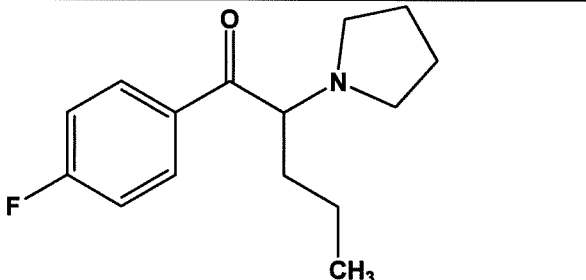
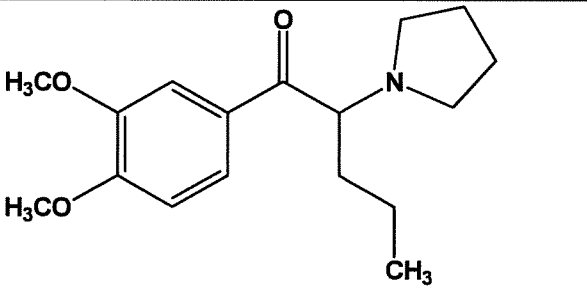
CV=Coeficiente de variación

- 20 **Tabla 2** Reactividad cruzada con otros compuestos de la familia de la pirrolidinofenona: Anticuerpo RS2922 recubierto a 2,5 µg/ml con trazador marcado HRP a una dilución de 1/128k.

Estándar	% Reactividad cruzada	CI_{50} (ng/ml)
I-PVP	100	0,315
I-pirrolidinopropiofenona	<3,150	>10
Pirovalerona	187,500	0,168
MDPV	178,977	0,176
MDPBP	20,561	1,532
(+/-) 4'-Metil-I-pirrolidinopropiofenona	<3,150	>10
Nafirona	142,534	0,221
4-Metoxi-I-pirrolidinopentiofenona	135,193	0,233

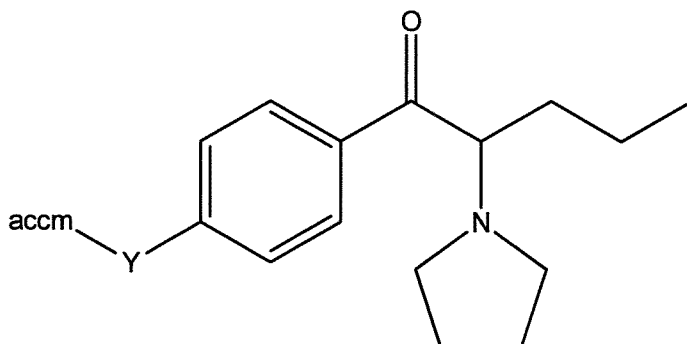
Tabla 3 – Estructuras químicas de los compuestos pirrolidinofenona

 a-PVP (a-Pirrolidinovalerofenona)	 MDPV (3',4'-Metilendioxi-a-pirrolidinopentiofenona)
 MPVP (PIROVALERONA) (4-Metil-a-pirrolidinopentiofenona)	 MOPVP (4'-Metoxi-a-pirrolidinopentiofenona)
 NAFIRONA	 MDPBP (3',4'-Metilendioxi-a-pirrolidinobutiofenona)
 MDPPP (3',4'-Metilendioxi-a-pirrolidinopropiofenona)	 MPBP (4'-Metil-a-pirrolidinobutiofenona)

 MPPP (4'-Metil-a-pirrolidinopropiofenona)	 MOPPP (4'-Metoksi-a-pirrolidinopropiofenona)
 MPHP (4'-Metil-a-pirrolidinoheksilfenona)	 a-PHPP (a-Pirrolidinoheptanofenona)
 a-POP (a-Pirrolidino-oktanofenona)	 4'-Fluoro-a-PVP
 3', 4'-Dimetoksi-a-PVP	

REIVINDICACIONES

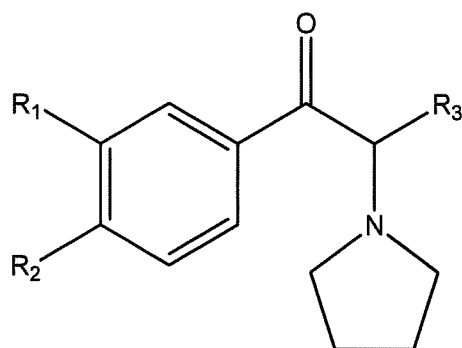
1. Un inmunógeno de estructura I:



Estructura I

En la que Y es un grupo de entrecruzamiento y accm es un material transportador que confiere antigenicidad.

- 5 2. El inmunógeno de la reivindicación 1 en el que Y es $-(A)_n-B-D-$ en el que B es un resto alquileo C_{1-10} , sustituido o no sustituido, que incorpora opcionalmente un resto cicloalquilo y/o heterocíclico; $n=0$ o 1 y A es un grupo funcional o heteroátomo que permite la unión del entrecruzador al anillo fenilo y D es un grupo funcional o heteroátomo que permite la unión del entrecruzador al material transportador que confiere antigenicidad.
3. El inmunógeno de la reivindicación 2 en el que B es un resto alquileo C_1-C_6 sustituido o no sustituido.
- 10 4. El inmunógeno de las reivindicaciones 2 o 3 en el que $n=1$, A es O, N o S y D es $-C(O)-$, $-NH-$, $-C=$, o $-S-$.
5. El inmunógeno de cualquier reivindicación previa en el que el accm se selecciona del grupo que consiste en tiroglobulina bovina, albúmina de suero bovino, hemocianina de lapa, gamma globulina bovina y ovoalbúmina de huevo.
- 15 6. Un anticuerpo que deriva de un inmunógeno de las reivindicaciones 1-5 y que se une a un epítipo de estructura II:



Estructura II

En la que R_3 es alquilo C_2-C_6 , R_1 y R_2 son H, alquilo C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_4 , alquilo C_1-C_4 sustituido con hidroxilo, carboxi o hidroxilo, o conjuntamente forman:



o

sustituido o no sustituido;

teniendo dicho anticuerpo una CI_{50} de menos de aproximadamente 5 ng/ml para cada uno de Alfa-PVP, Pirovalerona, MDPV, Nafirona y 4-Metoxi-alfa-pirrolidinopentiofenona.

- 25 7. El anticuerpo de la reivindicación 6 que tiene una CI_{50} de menos de aproximadamente 1 ng/ml para cada uno de Alfa-PVP, Pirovalerona, MDPV, Nafirona y 4-Metoxi-alfa-pirrolidinopentiofenona.

- 5 8. Un método para detectar o determinar uno o más de Alfa-PVP, Pirovalerona, MDPV, Nafirona y 4-Metoxi-alfa-pirrolidinopentiofenona en una muestra *in vitro* o en una disolución que comprende poner en contacto la muestra o disolución con un agente de detección y un anticuerpo de las reivindicaciones 6-7, detectar el conjugado unido y deducir la presencia de uno o más de Alfa-PVP, Pirovalerona, MDPV, Nafirona y 4-Metoxi-alfa-pirrolidinopentiofenona.
9. Un kit que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.
10. El kit de la reivindicación 9 en el que el anticuerpo se adsorbe a o se une a un dispositivo en estado sólido.
11. El kit de la reivindicación 10 en el que el dispositivo en estado sólido es un biochip de cerámica.

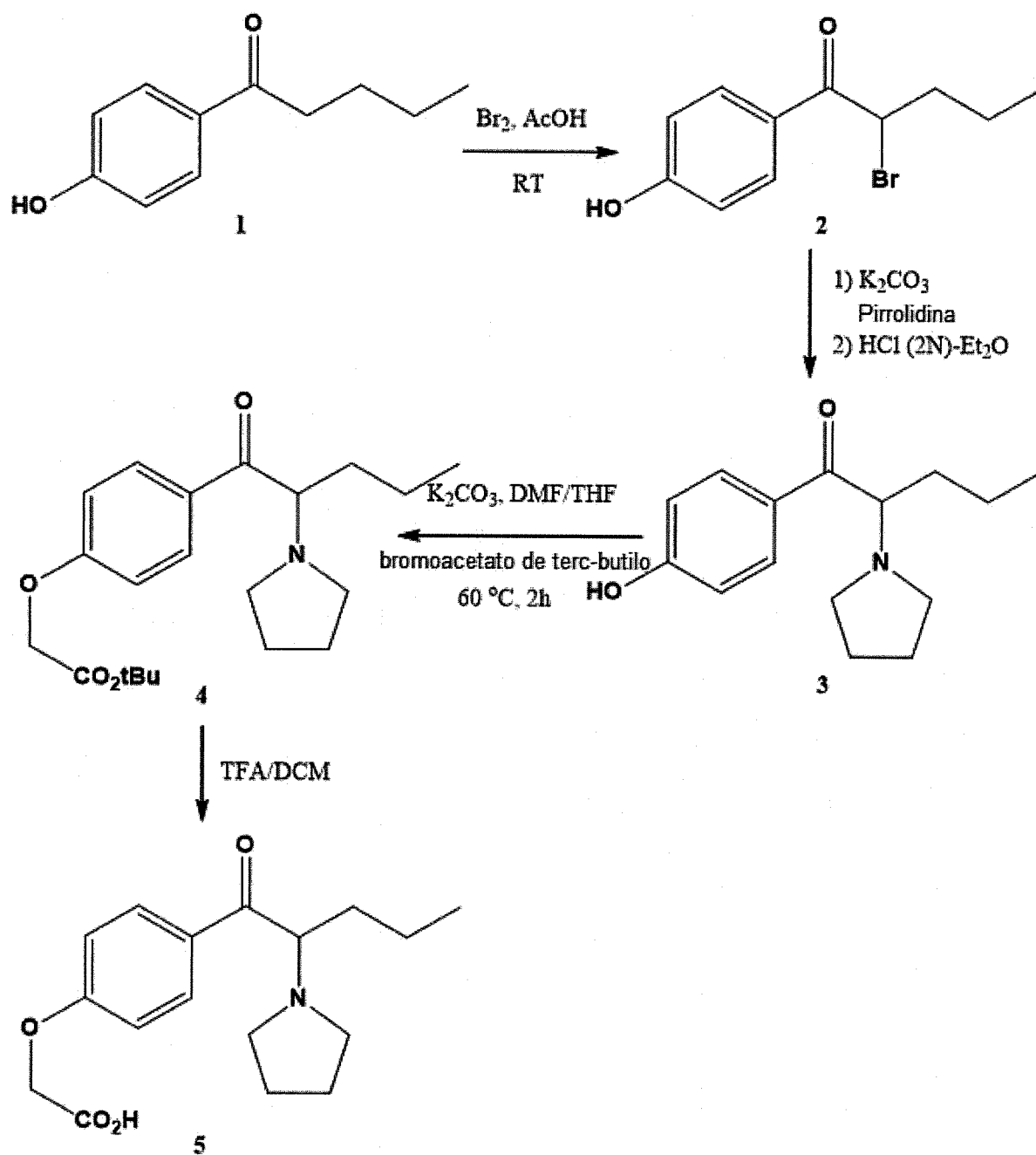


Figura 1

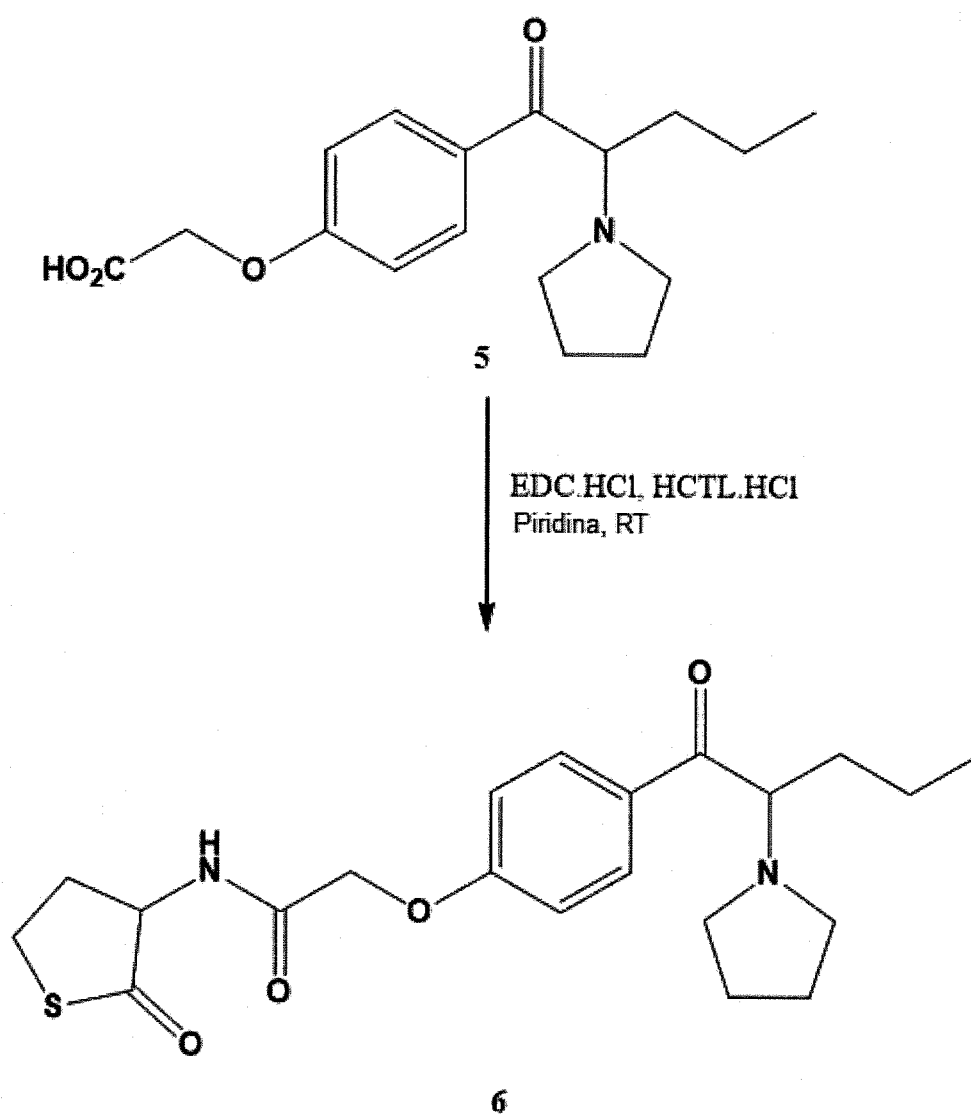
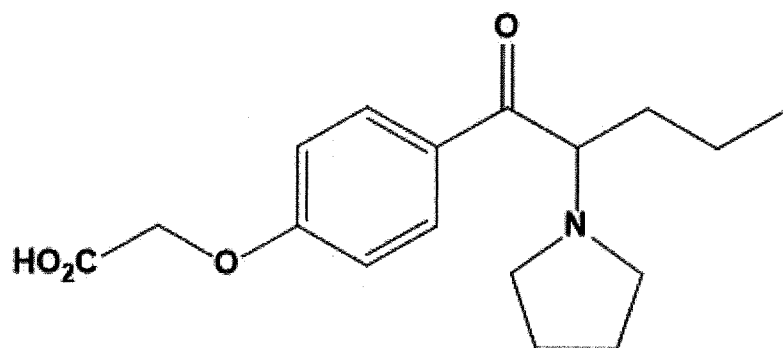
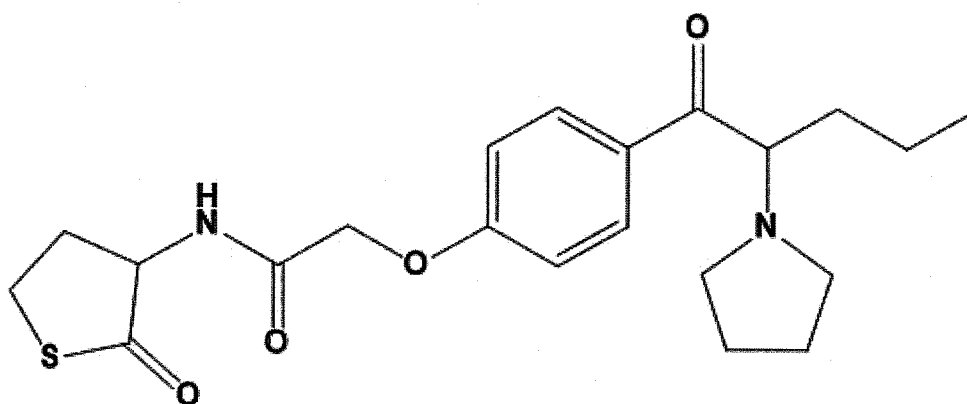


Figura 2



Hapteno-1



Hapteno-2

Figura 3

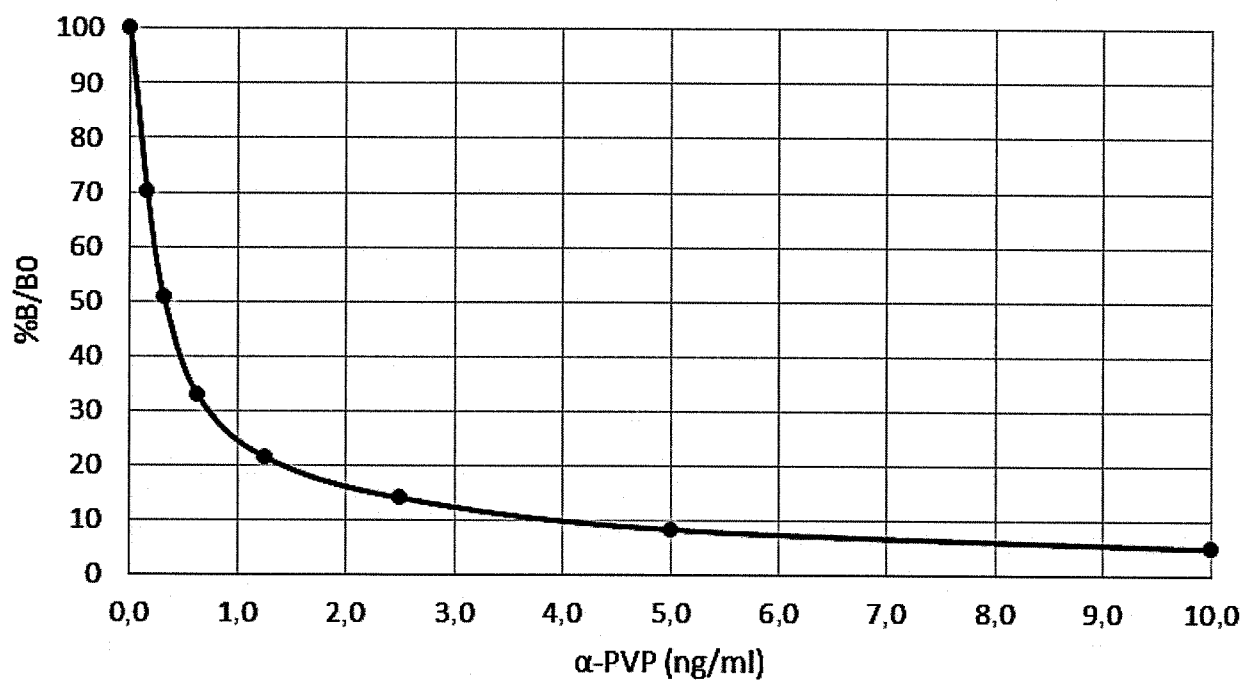


Figura 4