

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 100**

51 Int. Cl.:

C07D 317/48 (2006.01)
C07D 317/58 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2004 PCT/US2004/041622**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2005 WO05058865**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2004 E 04813878 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 1701949**

54 Título: **Ensayo para entactógenos**

30 Prioridad:

15.12.2003 US 736004

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.08.2018

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, YI, FENG;
LIU, HSHIOU-TING y
YANG, YALI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 679 100 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 entactógenos

Antecedentes de la invención

5 Esta invención se relaciona a métodos, composiciones y kits para detectar la presencia y/o cantidades de entactógenos en muestras sospechosas de contener el mismo. En particular, la invención se refiere a haptenos, inmunógenos y ensayos para la 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA), la 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), la 3,4-metilendioxi-etanfetamina (MDEA) y la 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA).

10 El campo del diagnóstico clínico ha experimentado una amplia expansión en los últimos años, tanto en cuanto a la variedad de materiales de interés que pueden determinarse fácilmente y con precisión, como a los métodos para la determinación. En la última década, las pruebas para drogas de abuso se han convertido en algo común. Esta prueba no es solo para la monitorización de delincuentes y drogadictos, sino que los empleadores también la usan para la selección de los trabajadores. En los últimos años, el inmunoensayo con base en la reacción de un anticuerpo con un antígeno ha sido ampliamente investigado para este fin. El inmunoensayo puede clasificarse aproximadamente en radioinmunoensayo, usando un isótopo radiactivo, inmunoensayo enzimático (EIA) usando una enzima y ensayos de luminiscencia, usando etiquetas fluorescentes, por ejemplo, polarización de fluorescencia y etiquetas quimioluminiscentes.

15 La anfetamina y la metanfetamina estimulan el sistema nervioso central y se han utilizado con fines medicinales para tratar la hipotensión, la narcolepsia y la obesidad. Debido a sus efectos estimulantes, los fármacos y los derivados han sido abusados.

20 Las drogas de diseño, metilendioxi-anfetamina (MDA), 1-3',4'-metilendioxi-fenil-2-propanamina, "pastillas de amor", metilenedioxi-metanfetamina (MDMA), "Adán", "éxtasis" y metilenedioxi-etanfetamina (MDEA), "Eva" son entactógenos, produciendo una sensación de euforia y amabilidad. Estas drogas son actualmente populares y se llaman "drogas delirantes". Varios estudios experimentales en ratas y humanos han demostrado que estas drogas son riesgosas para los humanos. De hecho, se han informado toxicidades y muertes asociadas con MDMA.

25 Las revisiones recientes también informaron la hepatotoxicidad, la neurotoxicidad, la psicopatología y el potencial de abuso de estas drogas. El uso común de estas drogas ha sido generalizado en el mundo y recientemente apareció como la droga de abuso más popular en ciertos países.

30 Aunque existe la necesidad de detectar MDMA, MDA y sus metabolitos, tales como 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), etc., la bibliografía divulga métodos de detección GC-MS, HPLC, que son de alto coste y lentos. Parece que los investigadores han intentado utilizar la tecnología existente de inmunoensayo de anfetamina/metanfetamina para la detección de MDMA y MDA debido a su reactividad cruzada. La esperanza era que el anticuerpo que reconoce la anfetamina y la metanfetamina también sería útil para los ensayos de MDMA, MDA o sus metabolitos. Por ejemplo, se han investigado tres ensayos comerciales de anfetamina/metanfetamina, específicamente, EMIT®, FPIA y RIA, para la detección de MDA, MDMA y MDEA. (Ruangyuttikarn, et al., "Comparison of three commercial amphetamine immunoassay for detection of methamphetamine, methylenedioxyamphetamine, methylenedioxy-methamphetamine and methylenedioxyethylamphetamine" J. Anal. Toxicol. 1988, 12, 229; Kunsman, et al., "Application of the Syva Emit and Abbott TDX amphetamine Immunoassays to the detection of 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) and 3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) in Urine" J. Anal. Toxicol. 1990, 14, 149; Cody, J. T. "Detection of D, L-amphetamine, D,L-methamphetamine, and illicit amphetamine analogs using diagnostic products corporation's amphetamine and methamphetamine radioimmunoassay" J. Anal. Toxicol. 1990, 14, 321; Ensslin, et al., "Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, 'Eve') and its metabolites in urine by gas chromatography spectrometry and fluorescence polarization immunoassay" J. Chromatogr. 1996, B683, 189.

35 El documento EP-A 1 340 981 divulga un derivado de N-etilanfetamina como un analito e inmunógeno para la producción de anticuerpos específicos para una droga de éxtasis (preferiblemente MDA (3,4-metilendioxi-anfetamina), MDMA (3,4-metilendioxi-N-metil-anfetamina), MDEA (3,4-metilendioxi-N-etilanfetamina), MDPA (3,4-metilendioxi-N-propilanfetamina), BDB (3,4-metilendioxi-fenil-2-butanamina) o MBDB (3,4-metilendioxi-fenil-N-metilbutanamina). También divulga un anticuerpo específico para una droga de éxtasis, un kit de reacción que comprende el anticuerpo, la preparación de un anticuerpo que implica inocular un huésped con dicho inmunógeno y detectar un analito en una muestra que implica poner en contacto la muestra con el anticuerpo, enlazar el anticuerpo al analito y detectar un aducto formado por el anticuerpo y el analito.

40 El documento EP 1 331 219 A1 divulga composiciones con base en anfetamina y derivados de anfetamina para el tratamiento del abuso de anfetaminas. Las composiciones incluyen derivados de anfetamina así como inmunoglobulinas o fragmentos o cadenas de los mismos que se enlazan específicamente a al menos dos análogos de anfetamina. Para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales, los animales se inmunizan con antígenos que comprenden grupos de unión enlazados al grupo aromático o a una cadena lateral del derivado de anfetamina para la conjugación con una proteína portadora. Los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden usarse en ensayos de detección de anfetamina y sus análogos o para el tratamiento de una sobredosis de una anfetamina.

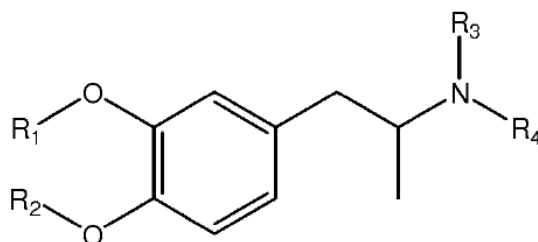
Sin embargo, de acuerdo con la literatura publicada, las metodologías anteriores han tenido poco o ningún éxito. Este resultado no es inesperado debido a las estructuras químicas muy diferentes entre la metanfetamina y los análogos de MDMA. Es decir,

5 MDMA y MDA tienen un anillo extra (metilendioxi) de cinco miembros en comparación con la metanfetamina y la anfetamina, respectivamente.

Existe, por lo tanto, la necesidad de ensayos para la detección de las drogas de diseño anteriormente mencionadas y, en algunos casos, sus principales metabolitos. Los ensayos deberían poder detectar las drogas de diseño para monitorizar y tratar a los pacientes adictos a estas drogas.

Sumario de la invención

10 Una realización de la presente invención es un compuesto de la fórmula:



Fórmula I

en la que los sustituyentes R₁, R₂, R₃ y R₄ tienen los significados como se define en las reivindicaciones.

15 Otra realización de la presente invención es un método para determinar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilanfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA). El método comprende proporcionar en combinación en un medio (i) una muestra sospechosa de contener el compuesto y (ii) un anticuerpo producido contra un compuesto de la fórmula que se muestra en la reivindicación 3, etapa a) que comprende una proteína. El medio se examina para detectar la presencia de un complejo que comprende el compuesto y el anticuerpo donde la presencia de un complejo como este indica la presencia del compuesto en la muestra. En un aspecto de la realización anterior, la combinación comprende además un conjugado de etiqueta del compuesto anterior.

20 Otra realización de la presente invención es un kit para determinar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilanfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA). El kit comprende (a) un anticuerpo generado contra dicho compuesto que comprende una proteína y (c) reactivos auxiliares para determinar el compuesto. El kit comprende adicionalmente (b) un conjugado de etiqueta del compuesto de la fórmula anterior.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 5 es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de un intermedio de HMMA (29) para inmunógeno (30).

La Figura 6 es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de inmunógeno HMMA-KLH (30).

30 La Figura 7 es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de inmunógeno HMMA-KLH (36).

La Figura 8A es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de hapteno MDMA (38).

La Figura 8B es un esquema de reacción que representa un ejemplo de una síntesis de intermedio de hapteno de MDMA (40).

Descripción de las realizaciones específicas

35 Los inmunógenos que comprenden proteínas se sintetizan y se usan para preparar anticuerpos específicos para 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilanfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA). Los anticuerpos pueden usarse en métodos para detectar las drogas mencionadas anteriormente en muestras sospechosas de contener las drogas. Los conjugados de etiqueta se preparan y pueden emplearse en los métodos anteriores. Se puede realizar un cribado efectivo de muestras para detectar la presencia de uno o más entactógenos como se mencionó anteriormente.

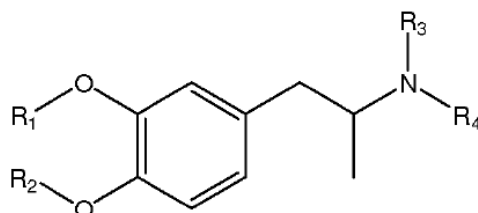
40

5 Los inmunógenos y los conjugados de etiqueta pueden involucrar un análogo de MDA, MDMA, MDEA o HMMA unidos a través del nitrógeno, o en el caso de HMMA alternativamente a través de la posición 4 del anillo de benceno, a una proteína o una etiqueta, respectivamente. El grupo de enlace puede comprender aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos sin contar hidrógeno y puede comprender una cadena de desde 2 a 8 átomos, cada uno independientemente seleccionado del grupo que consiste normalmente en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno, halógeno y fósforo. Donde el grupo de enlace proporciona la unión de una proteína a la posición 4 del anillo de benceno de HMMA, el grupo de enlace usualmente comprende al menos 5 átomos o, cuando es menor de 5 átomos, el grupo de enlace no comprende únicamente carbono u oxígeno.

10 El número de heteroátomos en los grupos de enlace normalmente variará de aproximadamente 0 a 6, usualmente desde aproximadamente 1 a 5. Los grupos de enlace pueden ser alifáticos o aromáticos. Cuando los heteroátomos están presentes, el oxígeno normalmente estará presente como oxo u oxi, enlazado a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno normalmente estará presente como nitro, nitroso o amino, normalmente enlazado a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre sería análogo al oxígeno; mientras que el fósforo se enlazaría a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, usualmente como fosfonato y fosfato mono o diéster. Las funcionalidades comunes para formar un enlace covalente entre el grupo de enlace y la molécula a conjugar son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato y ésteres de fosfato, amidas y tioésteres.

15 En su mayor parte, cuando un grupo de enlace tiene un grupo no oxocarbonilo que incluye análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, un agente alquilante como halo o tosilaalquilo, oxi (hidroxilo o análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona), u olefina activa tal como una vinilsulfona o un éster α -, β -insaturado, estas funcionalidades se unirán a grupos amino, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Donde se une una amina y un ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se formarán amidas, amidinas y fosforamidas. Donde el mercaptano y la olefina activada están unidos, se formarán tioéteres. Donde se unen un mercaptano y un agente alquilante, se formarán tioéteres. Donde aldehído y una amina se unen bajo condiciones reductoras, se formará una alquilamina. Donde se unen ácido carboxílico o ácido fosfato y un alcohol, se formarán ésteres. Diversos grupos de enlace son bien conocidos en la técnica; ver, por ejemplo, Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245:3059.

Como se mencionó anteriormente, un aspecto se refiere a los compuestos de la fórmula:



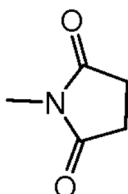
Fórmula I

en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ tienen el significado como se define en las reivindicaciones.

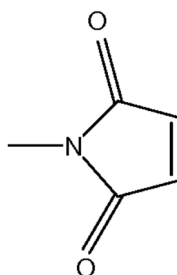
30 Por el término "alquilo inferior" se entiende un radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene 1 a 10, usualmente, 1 a 5, átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, butilo y pentilo, e incluye las formas normal, secundaria, terciaria, y similares, de los mismos donde sea apropiado.

Por el término "sales ácidas del mismo" se entiende sales formadas con ácidos tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácido clorhídrico, y similares, ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido trifluoroacético y similares.

35 Por "-succinimidilo" se entiende lo siguiente:



Por "-maleimidilo" se entiende lo siguiente:



Por el término "etiqueta" se entiende un miembro de un sistema de producción de señal. La etiqueta es capaz de detectarse directamente o es detectable a través de una reacción de enlace específica que produce una señal detectable. Las etiquetas generalmente son radioisotópicas, luminiscentes o enzimáticas. La etiqueta puede ser isotópica o no isotópica, usualmente no isotópica, y puede ser un catalizador que es una enzima, una molécula quimioluminiscente, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radioactivo, una pequeña molécula orgánica, una secuencia polinucleotídica amplificable, una partícula tal como látex o partícula de carbono, sol de metal, cristalita, liposoma, célula, etc., que pueden estar o no etiquetados adicionalmente con un pigmento, catalizador u otro grupo detectable, y similares.

El sistema de producción de señal puede tener uno o más componentes, al menos un componente es la etiqueta. El sistema de producción de señal genera una señal que se relaciona con la presencia de un entactógeno en una muestra. El sistema de producción de señal incluye todos los reactivos necesarios para producir una señal medible. Otros componentes del sistema de producción de señal pueden incluirse en una solución reveladora y pueden incluir sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, secuestrantes, iones metálicos, sustancias de enlace específicas requeridas para el enlace de sustancias generadoras de señal, y similares. Otros componentes del sistema de producción de señal pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores y similares. El sistema de producción de señal proporciona una señal detectable por medios externos, mediante el uso de radiación electromagnética, deseablemente por examen visual. Los sistemas a modo de ejemplo que producen señal se describen en la patente de los Estados Unidos No. 5,508,178 (Rose et al.).

El término "portador inmunogénico" significa un grupo que, cuando se conjuga con un hapteno y se inyecta en un mamífero, inducirá una respuesta inmune y provocará la producción de anticuerpos que se enlazan al hapteno. Los haptenos son compuestos capaces de enlazarse específicamente a los anticuerpos correspondientes, pero no actúan ellos mismos como inmunógenos (o antígenos) para la preparación de los anticuerpos. Los anticuerpos que reconocen un hapteno se pueden preparar contra compuestos comprendidos por el hapteno unido a un portador inmunogénico (o antigénico). Los portadores inmunogénicos también se denominan portadores antigénicos. Los portadores inmunogénicos típicos incluyen, sin limitación, poli (aminoácidos), polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas (materiales biológicos y sintéticos). Una amplia variedad de tales portadores se divulga en Davalian, et al., Patente de Estados Unidos No. 5,089,390, columna 4, línea 57 a columna 5, línea 5. Los portadores inmunogénicos incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas, proteínas séricas, por ejemplo, globulinas, proteínas de lente ocular y lipoproteínas, y así sucesivamente. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa de ojo de cerradura ("KLH"), ovoalbúmina de huevo, gamma-globulina bovina (BGG) y similares.

Síntesis

La síntesis de ejemplos representativos de los compuestos anteriores se discute aquí a modo de ilustración y no de limitación. Se sugerirán otros procedimientos sintéticos para las personas experimentadas en la técnica a la vista de la divulgación aquí. Otros compuestos dentro del alcance de la presente invención se pueden preparar usando variantes adecuadas de los reactivos empleados a continuación.

Una síntesis de ejemplo de un inmunógeno de HMMA se representa en la Figura 5 y en la Figura 6. Con referencia a la Figura 5, la Cetona 22 se somete a aminación reductora en un proceso de dos etapas. En la primera etapa, la cetona 22 se hace reaccionar, por ejemplo, con clorhidrato de metilamina bajo condiciones básicas. Generalmente, se emplea un medio acuoso regulado que contiene un disolvente orgánico, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol o similar. Esta etapa produce el compuesto intermedio 23, que se trata con un agente reductor tal como un hidruro metálico, por ejemplo, NaBH_3CN en un disolvente orgánico tal como un alcohol, por ejemplo, metanol y similares. El medio acuoso puede contener un regulador de carbonato tal como carbonato de sodio, carbonato de potasio y similares. El compuesto 24 se obtiene y se trata para proteger la funcionalidad amina, produciendo así el compuesto 25. Los grupos protectores adecuados son bien conocidos en la técnica y se han descrito en detalle en numerosas patentes y artículos en la literatura técnica. Véase, por ejemplo, "Principles of Peptide Synthesis" (M. Bodanszky, Springer Verlag, Berlín, Heidelberg, Nueva York, Tokio (1984). Ejemplos de tales grupos protectores, a modo de ejemplo y sin limitación, son t-butoxicarbonilo (t-Boc), fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), acetaminometilo (Acm), trifenil metilo (Trt), benciloxycarbonilo, bifenilisopropiloxycarbonilo, 1-amiloxycarbonilo, isoborniloxycarbonilo, alfa-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxycarbonilo, o-nitrofenil-sulfenilo, 2-ciano-1,1-dimetil-etoxycarbonil bromobenciloxi,

carbamoil, formil y similares. El grupo protector particular elegido depende de la naturaleza de la reacción a realizar y las condiciones de dicha reacción tales como temperatura, pH, y demás.

Haciendo referencia nuevamente a la Figura 5, el grupo protector empleado en esta síntesis de ejemplo es di-terc-butildicarbonato ((tBoc)₂O) en un disolvente orgánico acuoso tal como un éter, por ejemplo, THF y similares. Un carbonato adecuado tal como carbonato de potasio, carbonato de sodio, y similares, se incluye en el medio de reacción para proporcionar condiciones básicas. La reacción de 25 con bromoacetato de metilo en presencia de un hidruro metálico, por ejemplo, NaH, en un disolvente orgánico, por ejemplo, DMF, produce el compuesto 26. El grupo protector se elimina bajo condiciones ácidas en un disolvente orgánico para dar el compuesto 27. En el ejemplo representado, el compuesto 26 se trata con ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno. En general, la eliminación del grupo protector depende de la naturaleza del grupo protector. Las condiciones adecuadas para la eliminación de grupos protectores son bien conocidas en la técnica. El compuesto 27 se trata para convertirlo en el compuesto de sal de ácido clorhídrico 28. Las condiciones ejemplares implican hidrólisis bajo condiciones básicas tales como, por ejemplo, un carbonato tal como carbonato de potasio en un disolvente orgánico tal como metanol. Posteriormente, se agrega ácido clorhídrico para formar la sal de ácido clorhídrico. El compuesto 28 se trata para formar el compuesto 29 éster activado. Las condiciones de ejemplo incluyen, por ejemplo, la reacción con EDAC y NHS. Con referencia a la Figura 6, el inmunógeno 30 se obtiene por reacción del compuesto 29 con una proteína, por ejemplo, KLH y similares, en un regulador adecuado de pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,0, preferiblemente, aproximadamente 8, tal como, por ejemplo, un regulador de fosfato, por ejemplo, fosfato de sodio (0,1 M, pH= 8,0) y similares. El inmunógeno 30 puede purificarse como se discutió anteriormente.

La síntesis de otros inmunógenos de HMMA se puede lograr (Figura 7) utilizando el compuesto intermedio 25. La alquilación del grupo fenólico del compuesto 25 se puede lograr usando un alcano di-activado adecuado tal como, por ejemplo, dibromoetano, y así sucesivamente bajo condiciones básicas tales como, por ejemplo, un carbonato, por ejemplo, carbonato de potasio y similares, en un disolvente orgánico tal como un compuesto aromático, por ejemplo, tolueno y similares. El producto de la reacción anterior, concretamente, el compuesto 31 se trata con una sal de tioéster de un ácido orgánico tal como, por ejemplo, tioacetato de potasio, tiopropanoato de potasio y similares, en un disolvente orgánico acuoso tal como metanol, agua, etc. El compuesto 32 resultante se trata a continuación para eliminar el grupo protector e hidrolizar el acetato, de manera similar a la descrita anteriormente, para obtener el compuesto 34 de tiol. El bromoacetil-KLH 35 se obtiene por reacción de KLH con un éster activado de ácido bromoacético, específicamente, el éster N-hidroxi succinimida del ácido bromoacético en este ejemplo, bajo condiciones básicas, como se discutió anteriormente para la preparación del compuesto 15. La reacción del tiol 34 con bromoacetil-KLH 35 produce el compuesto 36 inmunogénico, que puede purificarse como se discutió anteriormente.

La síntesis del hapteno 38 HMMA vinilsulfona se expone en la Figura 8. La reacción del compuesto 25 con 1,3-dibromo-2-(metilsulfonyl)propano bajo condiciones básicas da el compuesto 37. Las reacciones son similares a las descritas anteriormente para las síntesis de la Figura 4. El hapteno 38 se obtiene mediante la eliminación del grupo protector como se discutió anteriormente.

Haciendo referencia nuevamente a la Figura 8, la alquilación de fenol 25 con, por ejemplo, bromoacetoniitrilo, bajo condiciones básicas tales como, por ejemplo, un carbonato en un disolvente orgánico, da el compuesto 39 intermedio. Las condiciones básicas son similares a las descritas anteriormente. En el ejemplo representado, el carbonato de potasio en DMF se emplea a temperatura elevada, por ejemplo, aproximadamente 80 °C. La reducción de 39 con un hidruro metálico tal como, por ejemplo, NaBH₄ y similares, en presencia de un haluro metálico del Grupo VIII (cloruro, bromuro, fluoruro y yoduro) tal como, por ejemplo, CoCl₂, FeCl₂ y así sucesivamente, produce amina 40, que se puede emplear para sintetizar un hapteno y también un inmunógeno por reacción con un portador inmunogénico.

Los ensayos de la presente invención usualmente implican reacciones entre parejas de enlace tales como un analito de entactógeno y un anticuerpo correspondiente o el enlace entre un anticuerpo y una pareja de enlace correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se enlaza al primer anticuerpo. Por consiguiente, la pareja de enlace puede ser una proteína, que puede ser un anticuerpo o un antígeno. La pareja de enlace puede ser un miembro de un par de enlace específico ("miembro sbp"), que es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en la superficie o en una cavidad, que se enlaza específicamente a y se define como complementaria con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de enlace específico generalmente serán miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de enlace específicos tales como biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácidos nucleicos, proteína A IgG, los pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN y similares no son pares inmunológicos, pero están incluidos dentro del alcance del miembro sbp.

Por consiguiente, el enlace específico implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para el otro en comparación con un reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, el enlace no específico involucra el enlace no covalente entre las moléculas que es relativamente independiente de las estructuras superficiales específicas. El enlace no específico puede ser el resultado de varios factores, incluidas las interacciones hidrófobas entre moléculas. Las parejas de enlace preferidas son anticuerpos.

Los inmunógenos preparados de acuerdo con la presente invención se pueden emplear para preparar anticuerpos específicos para un antígeno respectivo mencionado anteriormente. Un anticuerpo es una inmunoglobulina que se enlaza específicamente a y se define como complementaria con una organización espacial y polar particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede prepararse por técnicas que son bien conocidas en la técnica tales como la inmunización de un huésped y la colección de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares continuas híbridas y recolectando la proteína secretada (monoclonal) o por clonación y expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para el enlace específico de anticuerpos naturales.

Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, cuyas inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos donde sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de enlace por una molécula particular.

Los anticuerpos que contienen antisero (policlonal) se obtienen mediante técnicas bien establecidas que involucran la inmunización de un animal, tal como un conejo, cobaya o cabra, con un inmunógeno apropiado y la obtención de antisueros de la sangre del animal inmunizado después de un período de espera apropiado. Las revisiones del estado de la técnica las proporciona Parker, *Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds*, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., Estados Unidos, 1976), Butler, *J. Immunol. Meth.* 7:1-24 (1975); Broughton y Strong, *Clin. Chem.* 22: 726-732 (1976); y Playfair, et al., *Br. Med. Bull.* 30: 24-31 (1974).

Los anticuerpos también se pueden obtener mediante técnicas de hibridación de células somáticas, denominándose comúnmente estos anticuerpos como anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir de acuerdo con las técnicas estándar de Köhler y Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975. Las revisiones de las técnicas de anticuerpos monoclonales se encuentran en *Lymphocyte Hybridomas*, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (Nueva York 1978), *Nature* 266:495 (1977), *Science* 208:692 (1980), y *Methods of Enzymology* 73 (Part B): 3-46 (1981). Las muestras de una preparación de inmunógeno apropiada se inyectan en un animal tal como un ratón y, después de un tiempo suficiente, el animal se sacrifica y se obtienen las células del bazo. Alternativamente, las células del bazo de un animal no inmunizado pueden sensibilizarse al inmunógeno in vitro. Los cromosomas de células del bazo que codifican las secuencias de bases para las inmunoglobulinas deseadas pueden comprimirse fusionando las células del bazo, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol, con una línea celular de mieloma. Las células resultantes, que incluyen hibridomas fusionados, se dejan crecer en un medio selectivo, tal como medio HAT, y las células inmortalizadas sobrevivientes se cultivan en dicho medio usando condiciones de dilución limitante. Las células se hacen crecer en un recipiente adecuado, por ejemplo, pozos de microtitulación, y el sobrenadante se criba para anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada.

Existen diversas técnicas para potenciar los rendimientos de anticuerpos monoclonales, tales como la inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped mamífero, que acepta las células y cosecha el fluido de ascitis. Cuando una cantidad insuficiente del anticuerpo monoclonal se acumula en el fluido de ascitis, el anticuerpo se cosecha de la sangre del huésped. Alternativamente, la célula que produce el anticuerpo deseado puede cultivarse en un dispositivo de cultivo de células de fibra hueca o en un dispositivo de matraz giratorio, los cuales ambos son bien conocidos en la técnica. Existen diversas formas convencionales para el aislamiento y la purificación de los anticuerpos monoclonales de otras proteínas y otros contaminantes (véase Köhler y Milstein, supra).

En otra metodología para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica los sitios de enlace del anticuerpo se puede escindir del ADN cromosómico y se puede insertar en un vector de clonación que se puede expresar en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los sitios de enlace de anticuerpo correspondientes.

En general, los anticuerpos se pueden purificar mediante técnicas conocidas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía DEAE, cromatografía ABx y similares, filtración, etc.

Un análogo de analito es un analito modificado, que puede competir con el analito análogo para un receptor, la modificación proporciona los medios para unir un análogo de analito a otra molécula. El análogo del analito generalmente diferirá del analito en más que el reemplazo de un hidrógeno por un enlace que une el análogo del analito a un núcleo o etiqueta, pero no es necesario. El análogo del analito se puede enlazar al receptor de una manera similar al analito. El análogo puede ser, por ejemplo, un conjugado de etiqueta del analito, un anticuerpo dirigido contra el idiotipo de un anticuerpo contra el analito y similares.

Como se indicó anteriormente, los análogos de analito incluyen conjugados de etiqueta, que se pueden preparar a partir de ciertos haptenos descritos anteriormente mediante la incorporación de una etiqueta deseada. Los dos componentes pueden estar enlazados entre sí, opcionalmente a través de un grupo de enlace, para formar una única estructura. El enlace puede ser una unión covalente tal como una conexión directa, por ejemplo, un enlace químico, entre los componentes o entre los componentes y un grupo de unión o unión no covalente que involucra enlaces específicos entre miembros de pares de enlace específicos complementarios (sbp) que están unidos a los componentes. Los procedimientos empleados para la conjugación son bien conocidos en la técnica.

Típicamente, para la unión covalente, uno o más de los componentes contiene un grupo funcional adecuado para unirse a uno o más de los otros componentes. Los grupos funcionales adecuados para unir los componentes pueden ser funcionalidades carbonilo, tanto oxocarbonilo, por ejemplo, aldehído, como no oxocarbonilo (incluidos análogos de nitrógeno y azufre), por ejemplo, carboxi, amidina, amidato, tiocarboxi y tionocarboxi. Las funcionalidades alternativas de oxo incluyen halógeno activo, diazo, mercapto, olefina, particularmente olefina activada, amino, fósforo y similares. De interés particular son ésteres activados o agentes alquilantes. Los detalles de las técnicas para unir moléculas entre sí son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Matthews, et al., Anal. Biochem. (1985) 151:205-209; Engelhardt, et al., Solicitud de Patente Europea No. 0302175 y Patente de Estados Unidos No. 3,817,837.

Como se indicó anteriormente, los componentes, es decir, hapteno y la etiqueta, de los reactivos se pueden unir entre sí de forma no covalente. Por ejemplo, una molécula orgánica pequeña tal como, por ejemplo, biotina que incluye bis-biotina, fluoresceína o similares se puede incorporar en uno de los componentes y el otro componente se puede unir a una pareja de enlace para la molécula orgánica pequeña tal como, por ejemplo, respectivamente, estreptavidina, antilfluoresceína o similares. El enlace de las parejas de enlace da como resultado la unión no covalente de los componentes entre sí.

15 Ensayos

Los reactivos antes mencionados se pueden emplear en todos los tipos de inmunoensayos para determinar la presencia y/o cantidad de analitos entactogénicos en una muestra que se sospecha que contiene dichos analitos. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados comprenden habitualmente la formación de complejos antígeno-anticuerpo relativamente grandes. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitina y aglutinación y técnicas de dispersión de luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos antígeno-anticuerpo. Los inmunoensayos marcados incluyen inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayo de inhibición, ensayo de canalización de oxígeno luminiscente, y demás.

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos de antígenos o haptenos usando analito etiquetado con una concentración limitada de anticuerpo. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de todos los reactivos principales. Tales ensayos incluyen ensayos en sándwich de dos sitios, por ejemplo, ensayos inmunoradiométricos, ensayos inmunofluorométricos, ensayos inmunoluminométricos, ensayos ELISA, y demás. Otro grupo de inmunoensayos incluye precipitación, inmunoensayos nefelométricos y turbidimétricos, inmunoensayos de aglutinación de partículas, inmunoensayos de recuento de partículas y similares. Otro grupo de inmunoensayos son los ensayos homogéneos sin separación en los que los reactivos marcados modulan la señal de la etiqueta tras las reacciones de enlace antígeno-anticuerpo. Otro grupo de ensayos incluye ensayos competitivos limitados de reactivos etiquetados de anticuerpo para hapteno o antígeno que evitan el uso de antígenos o haptenos etiquetados problemáticos. En este tipo de ensayo, es importante que el analito inmovilizado en fase sólida esté presente en una cantidad constante y limitada. La partición de una etiqueta entre el analito inmovilizado y el analito libre depende de la concentración de analito en la muestra.

Los haptenos, conjugados de etiqueta y anticuerpos anteriormente mencionados pueden emplearse para realizar un inmunoensayo para los analitos entactógenos MDA, MDMA, HMMA y/o MDEA. Los ensayos pueden realizarse ya sea sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Syva Company, San Jose, CA) divulgado en Rubenstein, et al., Patente de Estados Unidos No. 3,817,837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los divulgados en Ullman, et al., Patente de Estados Unidos No. 3,996,345, columna 17, línea 59, columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los divulgados en Maggio, et al., Patente de Estados Unidos No. 4,233,402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se divulga, por ejemplo, en, entre otros, la Patente de Estados Unidos No. 5,354,693; y demás.

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por enzimas moduladas ("EMMIA") discutido por Ngo y Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116:285-288; el sustrato etiquetado inmunoensayo de fluorescencia ("SLFIA") divulgado por Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22:895-904; los inmunoensayos combinados de donantes de enzimas ("CEDIA") divulgados por Khanna, et al., Clin. Chem. Acta (1989) 185: 231-240; inmunoensayos etiquetados con partículas homogéneas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica mejorados con partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico mejorado con partículas ("PETIA"), etc.; y similares.

Ejemplos de ensayos heterogéneos son el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA") discutido en Maggio, E.T. supra; el radioinmunoensayo, divulgado en Yalow, et al., J. Clin. Invest. 39:1157 (1960) y demás.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de pigmento disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos enzimáticos de membrana ("EMIA"); luminoinmunoensayos ("LIA"); y demás.

Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensor que implican la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie inmovilizada por anticuerpo tras el enlace de un antígeno

o hapteno. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor de semiconductor, ensayos de inmunosensor de transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométrico, ensayos de electrodo amperométrico y similares.

5 Los reactivos anteriores también se pueden emplear en inmunoensayos de múltiples analitos donde uno o más analitos entactógenos pueden ser el sujeto de detección junto con uno o más analitos diferentes tales como otras drogas de abuso y similares. Dichos sistemas de múltiples analitos se describen en la patente de los Estados Unidos No. 5,135,836.

10 Los ensayos homogéneos o heterogéneos, particularmente los inmunoensayos enzimáticos y los inmunoensayos de polarización de fluorescencia, se llevan a cabo normalmente en un medio acuoso regulado a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir de 0 a aproximadamente 40 por ciento en volumen de un codisolvente. El pH para el medio estará habitualmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH generalmente será un compromiso entre el enlace óptimo de los miembros de enlace de cualquier par de enlace específico, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como los miembros del sistema de producción de señal, y demás.

15 Se pueden usar diversos reguladores para alcanzar el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El regulador particular empleado no es crítico para esta invención, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro regulador. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en el método de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, además de reguladores, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Con frecuencia, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de enlace, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similares.

20 Se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio a uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio usualmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca el enlace de diversos componentes de los reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y, por lo general, temperatura constante, preferiblemente temperatura ambiente, durante el período de medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan entre aproximadamente 5 °C a aproximadamente 99 °C, usualmente entre aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, más usualmente 20 °C a aproximadamente 45 °C. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 6 horas, usualmente, desde aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, más usualmente, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la tasa de enlace de los diversos reactivos, que está determinada por la constante de rata de asociación, la concentración, la constante de enlace y la constante de rata de disociación. Las temperaturas durante las mediciones oscilarán generalmente desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50 °C, más usualmente desde aproximadamente 15 a aproximadamente 40 °C.

25 La concentración de analito entactógeno que se puede ensayar generalmente varía desde aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, más usualmente desde aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-14} M. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (relativo a la cantidad de analito presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito determinarán normalmente las concentraciones de los diversos reactivos.

30 La concentración de analitos a detectar generalmente variará de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, más habitualmente de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-14} M. En general, se establece un nivel límite predeterminado para cada analito sospechoso de estar en una muestra. El nivel límite predeterminado particular generalmente se determina en base a analito por analito. Las personas experimentadas en la materia son conscientes de los factores relacionados con la selección de niveles límite predeterminados. Por ejemplo, para muchas drogas de abuso, los niveles límite están determinados por SAMSA, una agencia del Departamento de Salud y Servicios Humanos. La naturaleza del sistema de producción de señal puede ser una consideración para determinar los niveles límite predeterminados de algunos analitos. Otra consideración es que la variación esperada en la concentración de los analitos que es significativa debería proporcionar una diferencia de señal exactamente medible.

35 Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán por el intervalo de concentración de interés del analito entactógeno. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determinará empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo en el intervalo. Es decir, una variación en la concentración de analito entactógeno que es significativa debería proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema productor de señal y la naturaleza de, y los niveles de corte predeterminados para, los analitos entactógenos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Si bien el orden de adición puede variar ampliamente, habrá ciertas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden más simple de adición es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, los reactivos se pueden combinar secuencialmente. Opcionalmente, una etapa de incubación puede estar implicada después de cada adición, generalmente en el intervalo desde aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 6 horas, más usualmente desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora.

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación y están destinados a describir y no a limitar el alcance de la invención.

En un ensayo homogéneo después de que todos los reactivos se hayan combinado, la señal se determina y se relaciona con la cantidad de analito entactógeno en la muestra. Por ejemplo, en un ensayo EMIT para MDA, una muestra sospechosa de contener MDA se combina en un medio acuoso, ya sea simultánea o secuencialmente con un conjugado MDA-enzima y un anticuerpo capaz de reconocer MDA y el conjugado, los cuales se preparan de acuerdo con la presente invención. Generalmente, se agrega un sustrato para la enzima, que da como resultado la formación de un producto cromogénico o fluorogénico tras la reacción catalizada por enzima. Las enzimas preferidas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, pero se pueden emplear otras enzimas. El MDA y el conjugado MDA-enzima compiten por los sitios de enlace en el anticuerpo. Luego se determina la actividad de la enzima en el medio, usualmente por medios espectrofotométricos, y se compara con la actividad enzimática determinada cuando se prueban calibradores o muestras de referencia en las que está presente una cantidad conocida de MDA. Típicamente, los calibradores se prueban de una manera similar a la prueba de la muestra sospechosa de contener MDA. Los calibradores típicamente contendrán concentraciones diferentes, pero conocidas, del analito MDA a determinar. Preferiblemente, los intervalos de concentración presentes en los calibradores abarcarán el intervalo de concentraciones sospechosas de MDA en las muestras desconocidas.

Los ensayos heterogéneos generalmente implican uno o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Una diversidad de formatos de ensayo competitivos y no competitivos se divulgan en Davalian, et al., Patente de Estados Unidos No. 5,089,390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un ensayo competitivo típico un soporte que tiene un anticuerpo para un analito de entactógeno tal como, por ejemplo, un anticuerpo para MDA, enlazado a él se pone en contacto con un medio que contiene la muestra y un conjugado MDA-etiqueta donde MDA se conjuga con una etiqueta detectable tal como una enzima. Después de separar el soporte y el medio, la actividad de etiqueta del soporte o medio se determina mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de MDA en la muestra.

El soporte puede estar compuesto por un material insoluble en agua orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como partícula, incluyendo perla, película, membrana, tubo, pozo, tira, varilla, placa y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no suspenderse en el medio en el que se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli (cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon, poli(butirato de vinilo), etc.; ya sea usado solo o en conjunto con otros materiales.

El enlace de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y se puede llevar a cabo mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la bibliografía, como se discutió anteriormente. Véase, por ejemplo, " Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cautrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970). La superficie del soporte usualmente es polifuncional o es capaz de polifuncionalizarse o ser capaz de enlazarse a un miembro sbp, o similar, mediante interacciones covalentes o específicas o no específicas no covalentes. Tal enlace es indirecto cuando se usan interacciones no covalentes y es directa donde se emplean interacciones covalentes. Una amplia variedad de grupos funcionales están disponibles o pueden ser incorporados. Los grupos funcionales incluyen ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etileno, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. La manera de unir una amplia variedad de compuestos a superficies es bien conocida y está ampliamente ilustrada en la bibliografía (véase más arriba).

El enlace del anticuerpo para MDA y MDA da como resultado la formación de un complejo inmune que puede detectarse directa o indirectamente de numerosas maneras que son bien conocidas en la técnica. Los complejos inmunes se detectan directamente, por ejemplo, cuando los anticuerpos empleados se conjugan a una etiqueta. El complejo inmune se detecta indirectamente examinando el efecto de la formación del complejo inmune en un medio de ensayo en un sistema productor de señal o empleando un receptor etiquetado que se enlaza específicamente a un anticuerpo producido empleando uno de los conjugados de inmunógeno de hapteno de la invención.

La activación del sistema de producción de señal depende de la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señal. Para aquellos miembros de un sistema de producción de señales que se activan con luz, el miembro se irradia con luz. Para los miembros de sistemas de producción de señal que se encuentran en la superficie de una partícula, la adición de una base puede dar como resultado la activación. Se sugerirán otros métodos de activación para las personas experimentadas en la técnica a la vista de las divulgaciones aquí. Para algunos sistemas de producción de señales, no es necesario ningún agente para la activación, tal como los sistemas que implican una

etiqueta que es una etiqueta radioactiva, una enzima, y demás. Para los sistemas enzimáticos, puede ser necesario agregar un sustrato y/o un cofactor.

5 En ciertas realizaciones, pueden emplearse etiquetas primera y segunda y comprender un par de etiquetas. Estos pares de etiquetas pueden ser, por ejemplo, un generador de oxígeno singlete o sensibilizador y un par reactivo quimioluminiscente, un par enzimático en el que un producto de la primera enzima sirve como sustrato para la segunda enzima y un par donante y receptor de energía luminiscente, por ejemplo, un donante o receptor de energía y un compuesto fluorescente. La señal usualmente será iniciada por y/o detectada como radiación electromagnética y será preferiblemente luminiscencia como quimioluminiscencia, fluorescencia, electroluminiscencia o fosforescencia.

10 El examen para la presencia y la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro, un quimioluminómetro, un actinómetro, un instrumento fotográfico y similares. La presencia y cantidad de señal detectada está relacionada con la presencia y la cantidad del analito entactógeno presente en una muestra por encima del nivel de corte predeterminado. Las temperaturas durante las mediciones oscilan generalmente entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 70 °C, más usualmente entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 45 °C, más usualmente entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C. En una metodología, las curvas estándar se forman usando concentraciones conocidas de los analitos a cribar. Los calibradores y otros controles también se pueden usar.

20 La siguiente descripción de ciertas realizaciones de ejemplo de métodos usa el lenguaje "y/o", lo que significa que el método puede o no involucrar a cada artículo mencionado. Este lenguaje se usa en pro de la brevedad. En general, un método implicará al menos un anticuerpo para un analito, por ejemplo, metilendioxianfetamina, y al menos un conjugado enzimático que corresponde a ese analito, por ejemplo, un conjugado enzimático de una metilendioxianfetamina.

25 Una realización es un método para determinar anfetamina y/o metanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

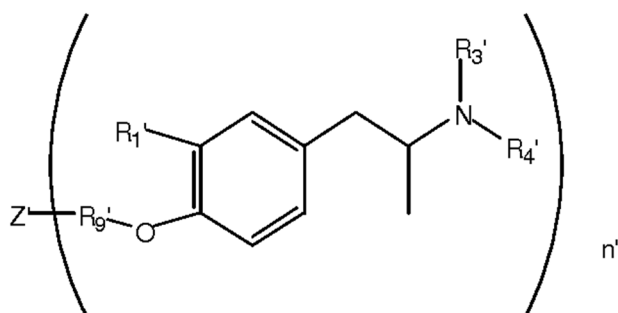
(i) dicha muestra,

(ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o

30 (iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y

(v) un compuesto de la fórmula:



35

en la que:

R^{1'} es H, o metilo o etilo, preferiblemente, H,

R^{3'} es H,

40 R^{4'} es H, o metilo o etilo,

R^{9'} es -(CH₂)_nC(O)R^{6'} o -(CH₂)_nR^{6'},

R^{6'} es Z', que es una enzima, tal como, por ejemplo, G6PDH,

n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha enzima dividido por aproximadamente 500; y

5 (b) examinar dicho medio por la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, la presencia de los mismos que indica la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

10 El examen puede comprender la medición de señal de la enzima, la cantidad de la misma está relacionada con la presencia de la metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en la muestra. El método puede ser un método homogéneo y el medio se examina para la cantidad de la señal. El método puede ser un método heterogéneo y el complejo, si está presente, se separa del medio y el medio o el complejo se examina para la cantidad de la señal. La enzima puede ser glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

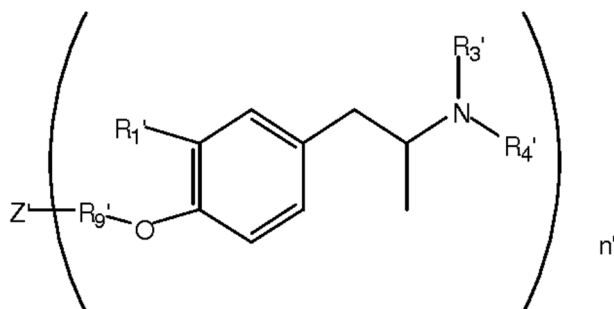
15 Una realización es un método para la determinación de metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en una muestra sospechosa de contener metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) dicha muestra,

20 (ii) un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxianfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioximetanfetamina y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxietanfetamina,

(iii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, dicho anticuerpo se produce contra un compuesto de la fórmula:



en la que:

25 R^{1'} es H, o metilo o etilo, preferiblemente, H,

R^{3'} es H,

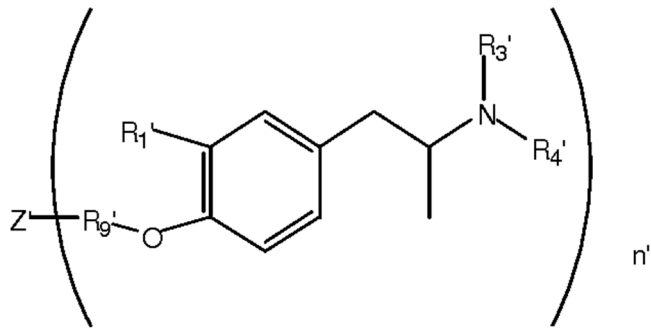
R^{4'} es H,

R^{9'} es -(CH₂)_nC(O)R^{6'} o -(CH₂)_nR^{6'},

30 R^{6'} es Z', que es una proteína inmunogénica, tal como, por ejemplo, -NH-proteína o un portador inmunogénico no poli(aminoácido),

n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido por aproximadamente 500; y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, dicho anticuerpo se produce contra un compuesto de la fórmula:



en la que:

R^{1'} es H, o metilo o etilo, preferiblemente, H,

5 R^{3'} es H,

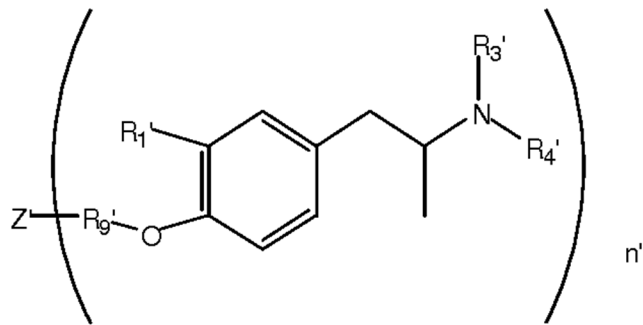
R^{4'} es metilo,

R^{9'} es $-(CH_2)_nC(O)R^{6'}$ o $-(CH_2)_nR^{6'}$,

R^{6'} es Z', que es una proteína inmunogénica, tal como, por ejemplo, -NH-proteína o un portador inmunogénico no poli(aminoácido),

10 n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido por aproximadamente 500; y/o

(v) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, dicho anticuerpo se produce contra un compuesto de la fórmula:



15 en la que:

R^{1'} es H, o metilo o etilo, preferiblemente, H,

R^{3'} es H,

R^{4'} es etilo,

R^{9'} es $-(CH_2)_nC(O)R^{6'}$ o $-(CH_2)_nR^{6'}$,

20 R^{6'} es Z', que es una proteína inmunogénica, tal como, por ejemplo, -NH-proteína o un portador inmunogénico no poli(aminoácido),

n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido por aproximadamente 500; y

25 (b) examinar dicho medio para detectar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, la presencia de los mismos que indica la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

El examen puede comprender la señal de medición de la enzima, la cantidad de la misma está relacionada con la presencia de la metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en la muestra. El método puede ser un método homogéneo y el medio se examina para la cantidad de la señal. El método puede ser un método heterogéneo y el complejo, si está presente, se separa del medio y el medio o el complejo se examina para la cantidad de la señal. La enzima puede ser glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Kits

Otro aspecto de la presente invención se refiere a kits útiles para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito entactógeno tal como, por ejemplo, 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxietil-anfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA). El kit comprende (a) un anticuerpo producido contra un conjugado de una proteína y un compuesto de Fórmula I y (b) reactivos auxiliares para determinar el compuesto. El kit puede comprender adicionalmente un conjugado de etiqueta del compuesto de Fórmula I anterior.

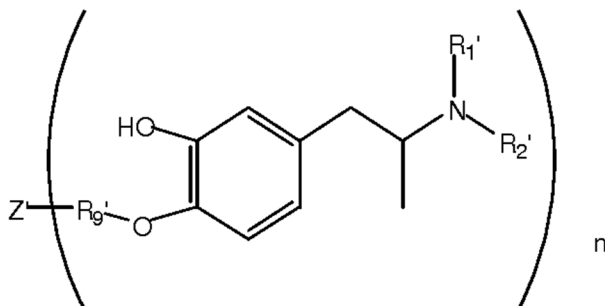
Para mejorar la versatilidad de la invención objeto, los reactivos del kit se pueden proporcionar en combinación empaquetada, en el mismo recipiente o en recipientes separados, en forma líquida o liofilizada, de manera que la proporción de los reactivos proporciona una optimización sustancial del método y el ensayo. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o diversos reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos.

El kit puede incluir además otros reactivos empaquetados por separado para realizar un ensayo tal como miembros de sbp adicionales, reactivos auxiliares tales como un sustrato de enzima auxiliar, y demás. Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que necesitan producirse durante el presente método y para optimizar adicionalmente de manera sustancial la sensibilidad del ensayo. Bajo circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, usualmente liofilizado, incluidos excipientes, que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con la presente invención. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método de acuerdo con la presente invención como se describió anteriormente.

La siguiente descripción de ciertas realizaciones de ejemplo de kits usa el lenguaje "y/o", lo que significa que el kit puede contener o no cada artículo mencionado. Este lenguaje se usa en pro de la brevedad. En general, un kit incluirá al menos un anticuerpo para un analito, por ejemplo, metilendioxianfetamina, y al menos un conjugado de enzima que corresponde a ese analito, por ejemplo, un conjugado enzimático de una metilendioxianfetamina.

Una realización particular es un kit que comprende una combinación empaquetada:

- (i) un anticuerpo para metilendioxianfetamina,
- (ii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- (iv) un compuesto de la fórmula:



en la que:

- R^{1'} es H,
- R^{2'} es H, o metilo o etilo,
- R^{9'} es -(CH₂)_nC(O)R^{5'} o -(CH₂)_nR^{5'},

R^{5'} es Z', que es una proteína inmunogénica o un portador inmunogénico no poli(aminoácido),

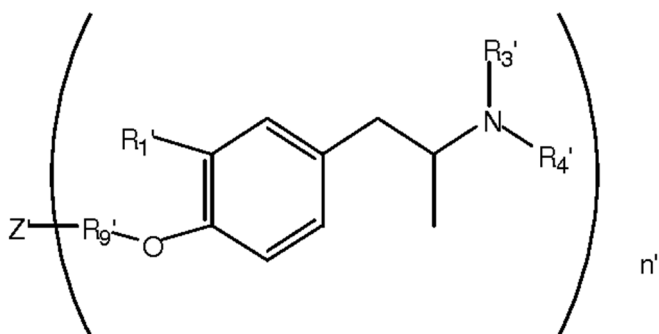
n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido por aproximadamente 500.

Otra realización de un kit comprende en combinación empaquetada:

5 (i) un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxianfetamina

y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioximetanfetamina, y/o un conjugado de una enzima y un análogo de metilendioxietanfetamina, y

(ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, dicho anticuerpo se produce contra un compuesto de la fórmula:



10 en la que:

R^{1'} es H, metilo o etilo, preferiblemente, H,

R^{3'} es H,

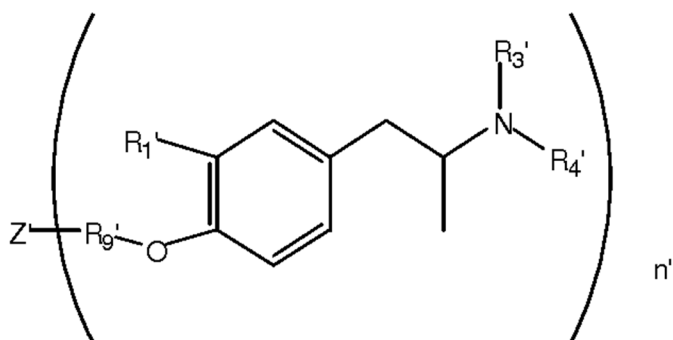
R^{4'} es H,

R^{9'} es -(CH₂)_nC(O)R^{6'} o -(CH₂)_nR^{6'},

15 R^{6'} es Z', que es una proteína inmunogénica, tal como, por ejemplo, -NH-proteína o un portador inmunogénico no poli(aminoácido),

n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido por aproximadamente 500; y/o

iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, dicho anticuerpo se produce contra un compuesto de la fórmula:



20

en la que:

R^{1'} es H, metilo o etilo, preferiblemente, H,

R^{3'} es H,

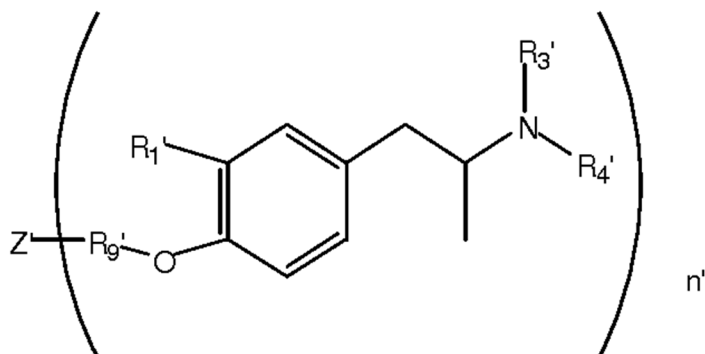
R^{4'} es metilo,

25 R^{9'} es -(CH₂)_nC(O)R^{6'} o -(CH₂)_nR^{6'},

R^{6'} es Z', que es una proteína inmunogénica, tal como, por ejemplo, -NH-proteína o un portador inmunogénico no poli(aminoácido),

n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido por aproximadamente 500, y/o

- 5 (iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, dicho anticuerpo se produce contra un compuesto de la fórmula:



en la que:

R^{1'} es H, metilo o etilo, preferiblemente, H,

R^{3'} es H,

- 10 R^{4'} es etilo,

R^{9'} es -(CH₂)_nC(O)R^{6'} o -(CH₂)_nR^{6'},

R^{6'} es Z', que es una proteína inmunogénica, tal como, por ejemplo, -NH-proteína o un portador inmunogénico no poli(aminoácido),

- 15 n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o dicho portador inmunogénico dividido por aproximadamente 500.

Ejemplos

La invención se demuestra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos ilustrativos. Las partes y porcentajes enumerados aquí son en peso a menos que se especifique lo contrario. Las temperaturas están en grados centígrados (°C).

- 20 La cromatografía en capa fina analítica (TLC) fue el método de análisis habitual y se realizó en placas con respaldo de vidrio Analtech Uniplate Gel de Sílice GF (0,25 mm) usando el disolvente especificado. Las manchas en TLC se visualizaron mediante luz ultravioleta (onda corta y/o larga) y/o vapores de yodo. La cromatografía ultrarrápida se llevó a cabo en gel de sílice Whatman 60 Å (malla 230-400). Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO), Fluka (Milwaukee, WI) y se usaron tal como se recibieron. Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se registraron rutinariamente en un espectrómetro Bruker Ultrashiel™ -400 (400 MHz) (Bruker, Billerica MA). El desplazamiento químico se informó en partes por millón (ppm, δ) y se relacionó con tetrametilsilano o con disolvente deuterado como referencia interna. Las abreviaturas de RMN utilizadas son s (singlete), d (doblete) y m (multiplete). Los espectros de masas se obtuvieron en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad de California en Berkeley, Berkeley, California.
- 30 Los puntos de fusión se determinaron en un aparato capilar Hoover y no se corrigieron. Los espectros infrarrojos se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer 2971R. Los espectros de absorción UV visible se realizaron en un espectrofotómetro de matriz de diodos HP 8452A. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro Spex fluorolog o en un espectrofotómetro Perkin Elmer 650-40.

Las siguientes abreviaturas tienen los significados que se establecen a continuación:

- 35 g - gramos
 mg - miligramos
 mL - mililitros
 µL - microlitros

mmol - milimoles

DMF - dimetil formamida

THF - tetrahidrofurano

RMN - resonancia magnética nuclear espectroscópica

5 MHz - megahertz

EDAC - clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (Sigma Chemical Company)

MeOH - metanol

FAB-MS - bombardeo de átomos rápidos - espectrometría de masas

Agua DI - agua desionizada

10 BCA Ensayo de concentración de proteínas - Pierce Chemical Company

TNBS ácido - 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico

KLH - hemocianina de lapa de ojo de cerradura

NHS - éster N-hidroxisuccinímico

THF - tetrahidrofurano

15 tBoc₂O - di-terc-butildicarbonato

TFA - ácido trifluoroacético

Preparación de anticuerpos

20 Los siguientes métodos se pueden emplear para preparar anticuerpos policlonales: Antisuero que contiene anticuerpos se obtiene mediante técnicas bien establecidas que implican la inmunización de un animal, como un conejo, cobaya o cabra, con un inmunógeno apropiado y la obtención de antisueros de la sangre del animal inmunizado después de un período de espera apropiado. Las revisiones de vanguardia son provistas por

Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., U.S., 1976), Butler, J. Immunol. Meth. 7:1-24 (1975); Broughton and Strong, Clin. Chem. 22:726-732 (1976); and Playfair, et al., Br. Med. Bull. 30:24-31 (1974).

25 El siguiente procedimiento se puede emplear para preparar anticuerpos monoclonales: Los anticuerpos monoclonales se producen de acuerdo con las técnicas estándar de Köhler y Milstein, Nature 265:495-497, 1975. Las revisiones de las técnicas de anticuerpos monoclonales se encuentran en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980), y Methods of Enzymology 73 (Parte B): 3-46 (1981). Las muestras de una preparación de inmunógeno apropiada se inyectan en un animal tal como un ratón y, después de un tiempo suficiente, el animal se sacrifica y se obtienen las células del bazo. Alternativamente, las células del bazo de un animal no inmunizado pueden sensibilizarse al inmunógeno in vitro. Los cromosomas de células del bazo que codifican las secuencias de bases para las inmunoglobulinas deseadas pueden comprimirse fusionando las células del bazo, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol, con una línea celular de mieloma. Las células resultantes, que incluyen hibridomas fusionados, se dejan crecer en un medio selectivo, tal como medio HAT, y las células inmortalizadas sobrevivientes se cultivan en dicho medio usando condiciones de dilución limitante. Las células se cultivan en un recipiente adecuado, por ejemplo, pozos de microtitulación, y el sobrenadante se criba para anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada.

40 Existen diversas técnicas para potenciar los rendimientos de anticuerpos monoclonales, tales como la inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped mamífero, que acepta las células y cosecha el fluido de ascitis. Cuando una cantidad insuficiente del anticuerpo monoclonal se acumula en el fluido de ascitis, el anticuerpo se recoge de la sangre del huésped. Alternativamente, la célula que produce el anticuerpo deseado puede cultivarse en un dispositivo de cultivo de células de fibra hueca o en un dispositivo de matraz giratorio, ambos de los cuales son bien conocidos en la técnica. Existen diversas formas convencionales para el aislamiento y la purificación de los anticuerpos monoclonales de otras proteínas y otros contaminantes (véase Köhler y Milstein, supra).

45 En general, los anticuerpos se pueden purificar mediante técnicas conocidas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía DEAE, cromatografía ABx y similares, filtración, y demás.

Preparación del compuesto (24)

A una solución de metilamina, clorhidrato (4,1 g, 60,72 mmol) en MeOH (50 ml) se añadió Na_2CO_3 (6,2 g, 58,5 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través de un matraz de fondo redondo de 100 ml que contenía 4-hidroxi-3-metilfenil acetona (22) (1,8 g, 10 mmol). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió cianoborohidruro sódico (628 mg, 10 mmol) a la mezcla. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 5 horas y durante este tiempo el pH de la solución se mantuvo en neutralidad mediante la adición de HCl 4 M en dioxano. El disolvente orgánico se evaporó a sequedad mediante evaporación rotativa y el residuo se disolvió en 20 ml de agua. La solución se acidificó con HCl 6 N a pH= 2-3, se extrajo con acetato de etilo, luego se basificó a pH= 9-10 con NaOH 6 N, saturado con NaCl. La mezcla se extrajo con acetato de etilo, los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se filtraron. El acetato de etilo se eliminó por evaporación para dar un aceite. El residuo oleoso se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando MeOH/ CH_2Cl_2 (1/4) como eluyente para dar el producto deseado (24) (532 mg, 27% de rendimiento); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6,82 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,65 (d, J= 7,4 Hz, 1H), 4,82 (s, OH), 3,85 (s, 3H), 3,46 (s, 3H), 2,75 (m, 1H), 2,587 (m, 2H), 1,06 (d, J= 6,2 Hz, 3H);

Preparación del compuesto (25)

A una solución de 24 (513 mg, 2,627 mmol) en THF (30 ml) y H_2O (20 ml) se añadió tBoc_2O (1,21 g, 5,25 mmol) y K_2CO_3 (1,09 g, 7,89 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió agua (20 ml) y la mayoría de THF se eliminó mediante evaporación rotatoria. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 40 ml). El disolvente orgánico combinado se lavó con agua (30 ml) y se secó sobre MgSO_4 . El disolvente se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (1/4) como eluyente para dar el producto deseado (25) (632 mg, 82%); FAB-MS: MH^+ (296); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6,80-6,52 (m, 3H), 5,96 (m, 1H, OH), 4,48, 4,19 (s, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,68-2,50 (m, 5H), 1,48-1,46 (m, 9H), 1,07-1,04 (m, 3H).

Preparación del compuesto (26)

A una solución de 25 (100 mg, 0,3385 mmol) en DMF (10 ml) se añadió NaH (77 mg, 3,05 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió bromoacetato de metilo (73 mg, 0,474 mmol) a la mezcla. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 65 horas. Se eliminó DMF mediante evaporación rotatoria y se añadió agua (10 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (15 ml) y se secaron sobre MgSO_4 . La fase orgánica se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (3/7) como eluyente para dar el producto deseado (26) (38 mg, 31% de rendimiento); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6,73 (m, 3H), 4,65 (s, 2H), 4,51, 4,24 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 2,79- 2,55 (m, 5H), 1,38-1,32 (m, 9H), 1,13 (bs, 3H).

Preparación del compuesto (27)

A una solución de 26 (19 mg, 0,0517 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml) se añadió TFA (0,3 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 120 minutos. El análisis de TLC de la reacción mostró que el material inicial (26) desapareció y se mostró una nueva mancha polar (gel de sílice, acetato de etilo/hexano = 2/3). La mayoría de CH_2Cl_2 y TFA se eliminaron por evaporación rotatoria bajo presión reducida. El residuo se puso a alto vacío para eliminar la cantidad traza de TFA. Esto dio el producto deseado (27) (19 mg, 96% de rendimiento); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7,54 (bs, NH), 6,72 (m, 3H), 4,66 (s, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,40 (m, 1H), 3,03 (1H), 2,79 (m, 1H), 2,72 (bs, 3H), 1,32 (d, J= 6,4 Hz, 3H).

Preparación del compuesto (28)

A una solución de 27 (18 mg, 0,0472 mmol) en MeOH (5 ml) y agua (1 ml) se añadió K_2CO_3 (33 mg, 0,239 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 180 minutos. Se añadió HCl 1 N para ajustar los valores de pH a 2-3. La mayoría de MeOH, HCl y agua se eliminaron mediante evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice) usando MeOH/ CH_2Cl_2 /AcOH (2/8/0,1) para dar el producto deseado (28) (12 mg, 88% de rendimiento); $^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 400 MHz) δ : 6,77 (m, 3H), 4,58 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,38 (m, 1H), 2,87 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 2,57 (s, 3H), 1,13 (d, J= 6,5 Hz, 3H).

Preparación de Inmunógeno de HMMA (30)

A una solución de 28 (10 mg, 0,0345 mmol) en DMF (0,6 ml) se añadió EDAC (20 mg, 0,1043 mmol) y NHS (19 mg, 0,165 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 2,5 horas. El hapteno activado (29) se añadió gota a gota bajo argón a 6 ml de solución de fosfato de sodio (0,1 M, pH= 8,0) de KLH (20 mg) a 0 °C bajo argón. El valor de pH cambió durante la adición y se usó una solución acuosa de NaOH 0,1 N para mantener el pH a 8,0. Después de completar la adición, el conjugado se dejó agitar a 4 °C durante 16 horas. El conjugado se dializó frente a solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (pH = 7,0, 3 litros) preparada a partir de solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (regulador Sigma, 400 ml) diluyendo con agua DE (2.600 ml) a 4 °C durante 4 horas. El procedimiento de diálisis se repitió con solución reguladora fresca durante 16, 24 y 40 horas. Finalmente, el conjugado se dializó con solución reguladora de fosfato de sodio (10 mM, pH= 7,0) dos veces (3 horas y 4 horas). La concentración de proteína se midió usando el Ensayo de Concentración de Proteína BCA y el método TNBS se usó

para la determinación del número de haptenos. El inmunógeno (30) tiene una concentración de 2,12 mg/ml con el número de haptenos de 1.436, y se usa para la inmunización de ratas para la producción de anticuerpos.

Preparación del compuesto (31)

5 A una solución de 25 (86 mg, 0,291 mmol) en tolueno (15 ml) se añadió K_2CO_3 (200 mg) y dibromoetano (2 ml). La reacción se sometió a reflujo durante 48 horas y se agitó a temperatura ambiente durante 66 horas. Se añadió agua (10 ml) y se separó tolueno. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). El disolvente orgánico combinado se lavó con agua (20 ml) y se secó sobre $MgSO_4$. El disolvente se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (1/4) como un eluyente para dar el producto deseado (31) (62 mg, 53%); 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6,78 (m, 3H), 4,26 (t, J= 6,6 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,60 (t, J= 6,7 Hz, 2H), 2,67 (m, 5H), 1,36 (m, 9H), 1,11 (bs, 3H).

Preparación del compuesto (32)

15 A una solución de 31 (61 mg, 0,1516 mmol) en etanol al 95% (10 ml) se añadió tioacetato de potasio (100 mg, 0,8756 mmol). La reacción se agitó a 55 °C bajo argón durante 3 horas. La mayor parte del etanol se eliminó mediante evaporación rotatoria. El residuo se redisolvió en 5 ml de CH_2Cl_2 y el precipitado se separó por filtración y se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 10 ml). El disolvente orgánico combinado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (3/7) como eluyente para dar el producto deseado (32) (50 mg, 83%); 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6,82 (m, 1H), 6,64 (m, 2H), 4,08 (t, J= 6,7 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,25 (t, J= 6,7 Hz, 2H), 2,65 (m, 5H), 2,33 (s, 3H), 1,33 (m, 9H), 1,10 (s, 3H).

Preparación del compuesto (33)

20 A una solución de 32 (48 mg, 0,1207 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml) se añadió TFA (0,4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El análisis de TLC de la mezcla mostró que el material de partida, 22 desapareció y se mostró una nueva mancha al inicio (gel de sílice, acetato de etilo/hexano = 1/1). La mayoría de CH_2Cl_2 y TFA se eliminaron mediante evaporación rotatoria. El residuo se puso a alto vacío para eliminar las trazas de TFA. Esto dio el producto deseado, (33) (49 mg, 98%); 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6,86 (m, 1H), 6,68 (m, 2H), 4,09 (t, J= 6,7 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,37 (m, 1H), 3,26 (t, J= 6,7 Hz, 2H), 3,07 (m, 1H), 2,70 (m, 4H), 2,34 (s, 3H), 1,28 (d, J= 6,4 Hz, 3H); ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 196,3, 150,3, 147,6, 128,8, 121,8, 117,5, 114,5, 113,3, 68,0, 57,7, 56,4, 39,6, 30,9, 28,6, 15,8.

Preparación de bromoacetil-KLH (35)

30 A una solución de éster NHS de ácido bromoacético (8,6 mg, 0,0364 mmol) en DMF (0,3 ml) se añadió a una solución de KLH (40 mg) en regulador NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH = 8,00, 0,1 M, 4 ml) a 4 °C. La mezcla de reacción se agitó en la cámara frigorífica (4 °C) durante 16 horas. La mezcla se cromatografió en un Sephadex G-50 empacado, eluyendo con regulador NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH= 8,00, 0,1 M) con un caudal de 20 ml/hora. Las fracciones eluidas (4 ml en volumen para cada fracción) de la columna se controlaron mediante UV a 280 nm. Las fracciones #10-13 se agruparon para dar 12 ml de bromoacetil-KLH (35). La concentración de proteína se midió por el método de UV y el método de TNBS se usó para la determinación del número de haptenos. El conjugado tiene una concentración de 3,28 mg/ml con el número de haptenos de 925.

Preparación del inmunógeno HMMA (36)

40 A una solución de 33 (25 mg, 0,06 mmol) en MeOH (0,5 ml) y agua (0,1 ml) se añadió K_2CO_3 (20 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 1,5 horas. El análisis de TLC de la mezcla mostró que una nueva mancha mostraba ser el producto (34). 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6,84 (m, 1H), 6,68 (m, 2H), 4,26 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,11 (m, 2H), 3,07 (m, 1H), 2,73 (m, 1H), 2,58 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 1,05 (d, J= 6,2 Hz, 3H).

45 A una solución de bromoacetil-KLH (35) bien preparada (8 ml, 3,28 mg/ml, pH= 8,00) se añadió la mezcla de reacción anterior lentamente a 4 °C bajo argón. La reacción se agitó a 4 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se cromatografió en una columna Sephadex G-50, que se equilibró con regulador NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH= 7,20, 0,1 M, 200 ml). La columna se eluyó con regulador NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH= 7,20, 0,1 M) con un caudal de 20 ml/hora. Las fracciones eluidas (4 ml en volumen para cada fracción) de la columna se controlaron mediante UV a 280 nm. Las fracciones #10-14 se recolectaron para tener 20 ml de inmunógeno (36). La concentración de inmunógeno se midió usando el Ensayo de Concentración de Proteína BCA. El inmunógeno (36) tiene una concentración de 2,41 mg/ml con el número de haptenos de 925 y se usó para la inmunización de ratones para la producción de anticuerpos.

Preparación del compuesto (37)

50 A una solución de 25 (32 mg, 0,108 mmol) en THF (12 ml) se añadió NaH (19 mg, 0,752 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió 1,3-dibromo-2-(metilsulfonil) propano (43,8 mg, 0,156 mmol) a la mezcla de reacción, que se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua (0,1 ml) y la mayor parte del THF se eliminó mediante evaporación rotatoria bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/2) como eluyente para dar el

55

producto deseado (37) (38 mg, 85,2% de rendimiento); FAB-MS: MLi⁺ (420); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,82 (m, 1H), 6,70 (m, 2H), 6,45, 6,36 (s, 1H), 6,16, 6,03 (s, 1H), 4,85 (s, 2H), 3,90 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,14 (s, 3H), 2,70 (m, 5H), 1,32 (m, 9H), 1,11 (bs, 3H).

Preparación del compuesto (38)

- 5 A una solución de 37 (19 mg, 0,046 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se añadió TFA (0,3 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 120 minutos. El análisis de TLC de la reacción mostró que el material inicial (26) desapareció y se mostró una nueva mancha polar (gel de sílice, acetato de etilo/hexano= 1/2). La mayoría de CH₂Cl₂ y TFA se eliminaron por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se secó adicionalmente a alto vacío para eliminar trazas de TFA. Esto dio el producto deseado (38) (19 mg, 96% de rendimiento); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,84 (m, 1H), 6,70 (m, 2H), 6,49 (s, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,84 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,40 (m, 1H), 3,16 (s, 3H), 3,02 (m, 1H), 2,72 (m, 4H), 1,32 (d, J= 6,1 Hz, 3H).

Preparación del compuesto (39)

- 15 A una solución de 25 (200 mg, 0,677 mmol) en DMF (15 ml) se añadió K₂CO₃ (280 mg, 2,03 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió bromoacetronitrilo (812 mg, 6,77 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 18 horas. La mayoría del DMF se eliminó mediante evaporación rotatoria bajo presión reducida y se añadió agua (20 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 40 ml). El disolvente orgánico combinado se lavó con agua (20 ml) y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/3) como eluyente para dar el producto deseado (39) (204 mg, 90% de rendimiento); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,76 (m, 3H), 4,74 (s, 2H), 4,26 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,67 (m, 5H), 1,35 (m, 9H), 1,11 (m, 3H).

Preparación del compuesto (40)

- 25 A una solución de 39 (50 mg, 0,15 mmol) en MeOH (8 ml) se añadió CoCl₂ 6H₂O (85 mg, 0,363 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió NaBH₄ (58 mg, 1,53 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas y luego se filtró. El precipitado negro formado a partir de la reacción se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice) usando MeOH/CH₂Cl₂ (1/4) como eluyente para dar el producto deseado (40) (11 mg) con recuperación de material inicial, 39. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,78 (m, 3H), 5,28 (m, NH), 4,51, 4,24 (m, 1H), 4,00 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,07 (m, 2H), 2,69 (m, 5H), 1,35 (m, 9H), 1,12 (m, 3H).

- 30 Ensayo que usa reactivos de acuerdo con realizaciones de la presente invención

- 35 Los anticuerpos y los conjugados enzimáticos se pueden emplear en ensayos para la detección de los analitos respectivos. El inmunógeno 10 (que no es parte de esta invención) se inyecta en ovejas para producir anticuerpos. El anticuerpo obtenido del sangrado de oveja se siembra en el diluyente de anticuerpo para preparar el reactivo de anticuerpo. El reactivo de anticuerpo consiste en el anticuerpo tal como se preparó anteriormente, regulador, estabilizadores, conservantes y los sustratos para la enzima conjugada NAD y glucosa 6 fosfato.

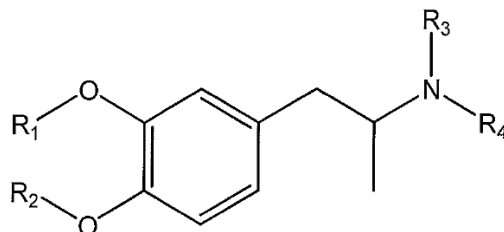
El conjugado de enzima del compuesto 8 (que no forma parte de esta invención) anterior se siembra en el reactivo conjugado para preparar el reactivo conjugado enzimático. El reactivo conjugado enzimático consiste en conjugado, regulador, estabilizadores y conservantes.

- 40 El reactivo de anticuerpo y el reactivo conjugado de enzima se utilizan en un formato de ensayo homogéneo para detectar éxtasis en muestras de orina. El analizador (instrumento) utilizado para configurar el ensayo es Syva 30-R Analizador Bioquímico (Syva Company, Cupertino CA). El éxtasis que contiene la muestra de orina se incuba con reactivo de anticuerpo seguido de la adición del reactivo conjugado enzimático. La actividad del conjugado enzimático disminuye al enlazarse al anticuerpo. El conjugado enzimático, que no está enlazado al anticuerpo, cataliza la oxidación de la glucosa 6-fosfato (G6P). La oxidación de G6P se acopla con la reducción de NAD⁺ a NADH, que se puede medir a 340 nm. El cambio en la absorbancia a 340 nm se puede medir espectrofotométricamente. La concentración de éxtasis en una muestra de orina se puede medir en términos de actividad de G6PDH. El aumento en la rata a 340 nm se debe a la formación de NADH y es proporcional a la actividad conjugada de la enzima. Se genera una curva de ensayo usando MDMA sembrada en orina negativa. La rata de ensayo aumenta al aumentar la concentración de droga libre en la muestra.

- 50 Los inmunógenos 30 y 36 se usaron para preparar anticuerpos de acuerdo con métodos similares a los descritos anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



Fórmula I

en la que:

5 R₁ es H, alquilo inferior o un grupo protector, en el que el término alquilo inferior representa un radical hidrocarburo monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, y en el que el grupo protector es t-butoxicarbonilo (t-Boc), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetaminometilo (Acm), trifenil metilo (Trt), benciloxicarbonilo, bifenilisopropiloxicarbonilo, 1-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, alfa-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, o-nitrofenil-sulfenilo, 2-ciano-1,1-dimetil-etoxicarbonilo bromobenciloxi, carbamoilo o formilo

10 R₂ es $-(CH_2)_nC(O)R_6$ o $-(CH_2)_nR_6$,

15 R₃ y R₄ son independientemente H o alquilo inferior o un grupo protector, en el que el término alquilo inferior representa un radical hidrocarburo monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, y en el que el grupo protector es t-butoxicarbonilo (t-Boc), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetaminometilo (Acm), trifenil metilo (Trt), benciloxicarbonilo, bifenilisopropiloxicarbonilo, 1-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, alfa-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, o-nitrofenil-sulfenilo, 2-ciano-1,1-dimetil-etoxicarbonilo bromobenciloxi, carbamoilo o formilo

20 R₆ es una etiqueta, en la que el término etiqueta representa un catalizador, que es una enzima, una molécula quimioluminiscente o un radioisótopo, que puede o no estar etiquetado adicionalmente con un pigmento, un catalizador u otro grupo detectable, y n es un número entero desde 1 a 5,

e incluyendo sales ácidas de los mismos.

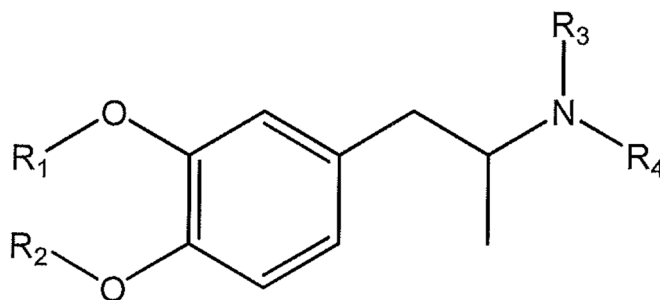
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 1.

25 3. Un método para determinar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilamfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA), comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) una muestra sospechosa de contener dicho compuesto y

(ii) un anticuerpo producido contra un compuesto de la fórmula



30 en la que:

R₁ es H, alquilo inferior, o se toma junto con R₂ para formar un anillo,

R₂ es H, alquilo inferior, $-(CH_2)_nC(O)R_6$ o $-(CH_2)_nR_6$ o se toma junto con R₁ para formar un anillo,

R₃ y R₄ son independientemente H o alquilo inferior, o, cuando R₁ se toma junto con R₂ para formar un anillo,

al menos uno de R₃ y R₄ es -(CH₂)_nC(O)R₅ o -(CH₂)_nR₅, o, cuando R₁ no se toma junto con R₂ para formar un anillo, al menos uno de R₁ y R₂ no es H o alquilo inferior,

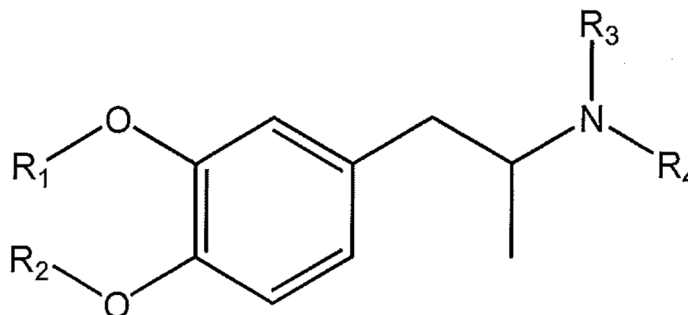
5 en el que en R₁ a R₄, el término alquilo inferior representa un radical hidrocarburo monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

R₅ es un portador inmunogénico,

R₆ es un portador inmunogénico, y

n es un número entero desde 1 a 5

(iii) una etiqueta conjugada de la fórmula:



10

en la que:

R₁ es H, alquilo inferior, en el que el término alquilo inferior representa un radical hidrocarburo monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

R₂ es -(CH₂)_nC(O)R₆ o -(CH₂)_nR₆,

15 R₃ y R₄ son independientemente H o alquilo inferior, en el que el término alquilo inferior representa un radical hidrocarburo monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene 1 a 10 átomos de carbono,

R₆ es una etiqueta, en la que el término etiqueta representa un catalizador, que es una enzima, una molécula quimioluminiscente o un radioisótopo, que puede o no estar marcado adicionalmente con un pigmento, un catalizador u otro grupo detectable, y

20 n es un número entero desde 1 a 5, y

(b) examinar dicho medio por la presencia de un complejo que comprende dicho compuesto y dicho anticuerpo, cuya presencia indica la presencia de dicho compuesto en dicha muestra, en la que

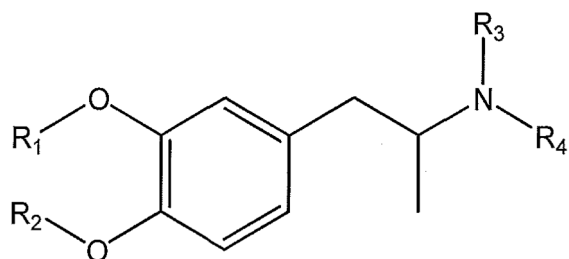
25 dicho examen comprende medir la señal de dicha etiqueta, estando relacionada la cantidad de la misma con la presencia de dicho compuesto en dicha muestra, en la que dicho método es un método homogéneo y dicho medio se examina para la cantidad de dicha señal.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que n es 1.

5. Un kit para determinar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-etilanfetamina (MDEA) y 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), dicho kit comprende:

30 (a) un anticuerpo para dicho compuesto,

(b) un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un conjugado de etiqueta de la fórmula:



en la que:

R₁ es H o alquilo inferior, en el que el término alquilo inferior representa un radical hidrocarburo monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

5 R₂ es $-(CH_2)_n C(O)R_6$ o $-(CH_2)_n R_6$,

R₃ y R₄ son independientemente H o alquilo inferior, en el que el término alquilo inferior representa un radical hidrocarburo monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene 1 a 10 átomos de carbono,

R₆ es una etiqueta que es una enzima, una molécula quimioluminiscente o un radioisótopo, y

n es un número entero desde 1 a 5, y

10 (c) reactivos auxiliares para determinar dicho compuesto.

6. Un método para la determinación de metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

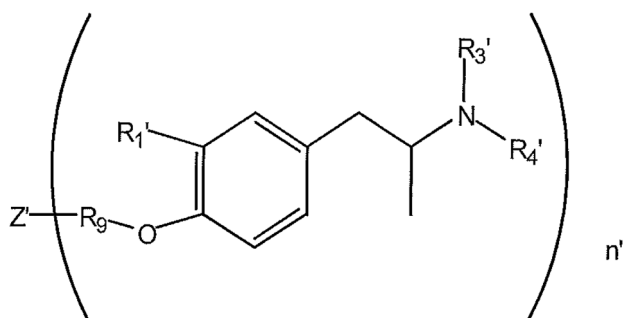
15 (i) dicha muestra,

(ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o

(iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y

(ii) un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de la fórmula:



20

en la que:

R₁' es H, o metilo o etilo

R₃' es H,

R₄' es H, o metilo o etilo,

25 R_g es $-(CH_2)_n C(O)-$ o $-(CH_2)-$,

Z' que es una enzima,

n es un número entero desde 1 a 5,

n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha enzima dividido por aproximadamente 500; y

- (b) examinar dicho medio para la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxi-metanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, su presencia que indica la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioxi-metanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.
- 5

Figura 5. Síntesis de Intermedio (29) HMMA para Inmunógeno (30)

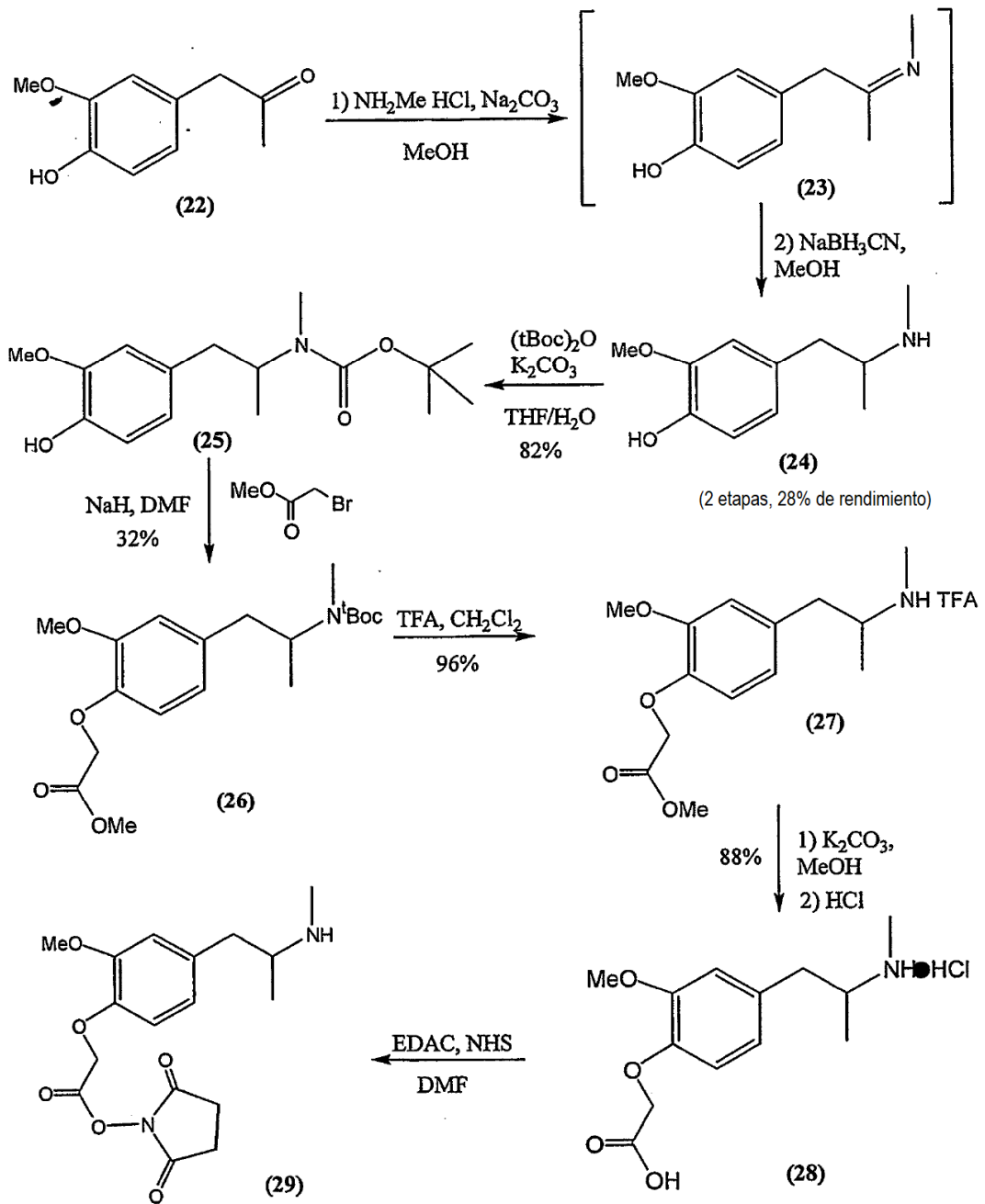


Figura 6. Síntesis de Inmunógeno (30) HMMA-KLH

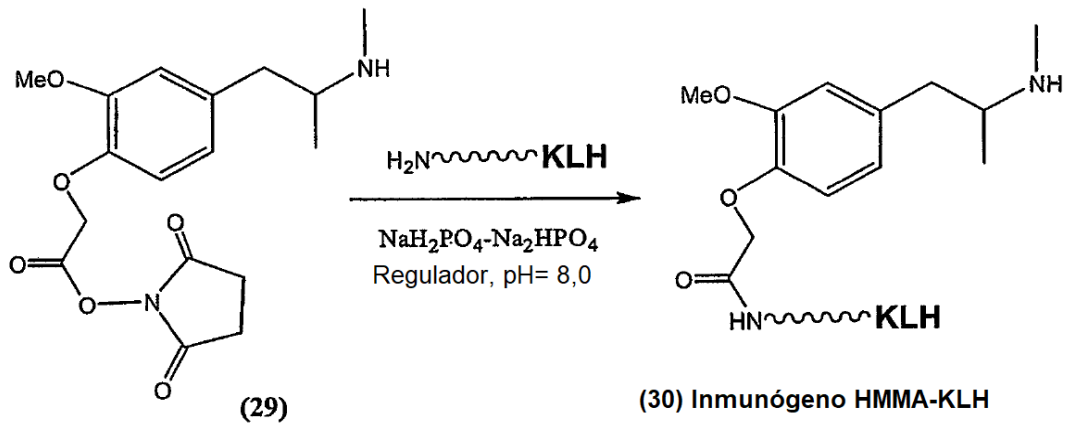


Figura 7. Síntesis de Inmunógeno (36) HMMA-KLH

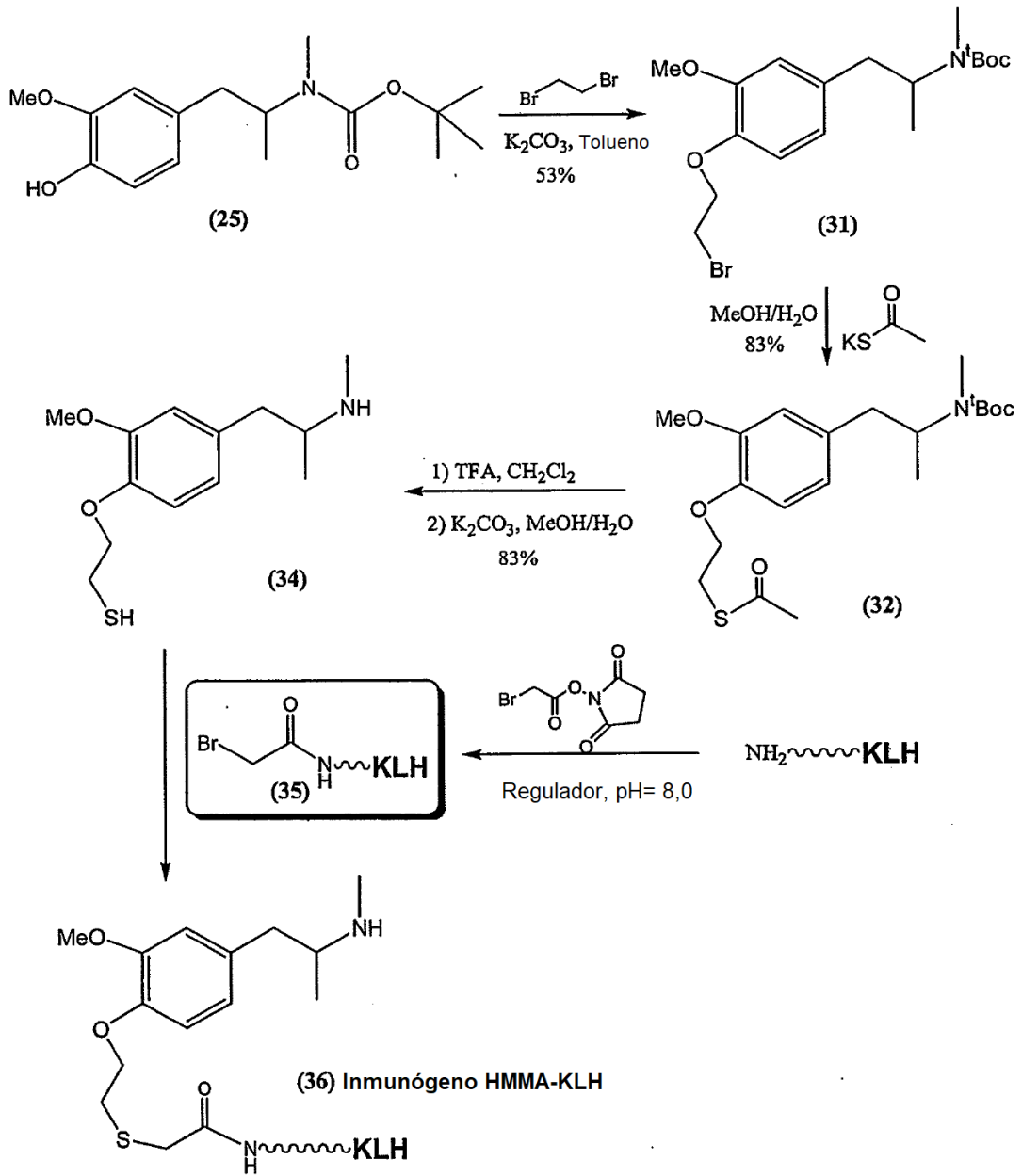


Figura 8A. Síntesis de Hapteno (38) MDMA

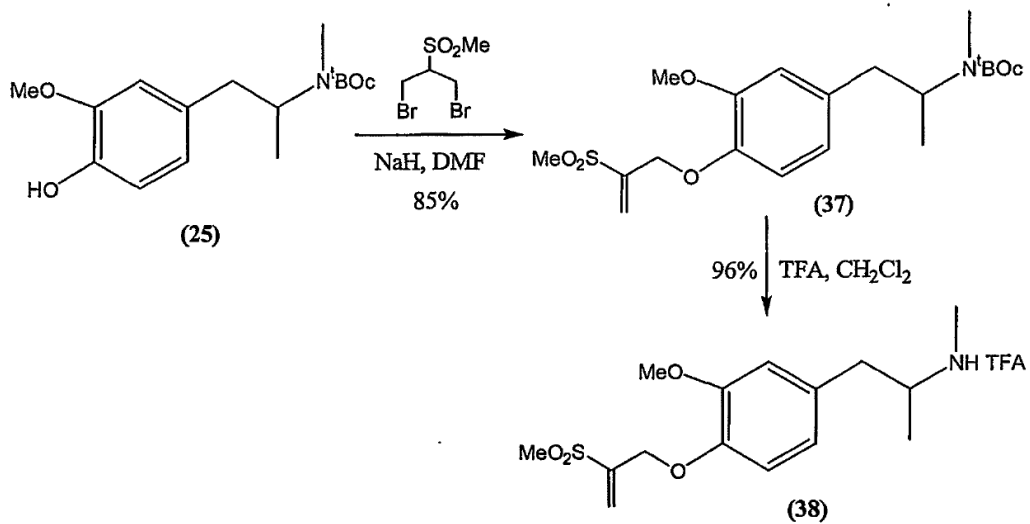


Figura 8B. Síntesis de Intermedio (40) de Hapteno MDMA

